

**Biologische Charakterisierung von Naturstoffen und  
Naturstoffderivaten unter besonderer  
Berücksichtigung von High-Content Analysemethoden**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Randi Ev Diestel  
aus Göttingen

1. Referent: Professor Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: Professor Dr. Ludger Beerhues

eingereicht am: 24.02.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am: 24.06.2010

Druckjahr 2010

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Biersack, B., Diestel, R., Jagusch, C., Rapp, G., Sasse, F. & Schobert, R. First syntheses of melophlins P, Q, and R, and effects of melophlins on the growth of microorganisms and tumor cells. *Chemistry & Biodiversity* 5: 2423-2430 (2008).

Biersack, B., Diestel, R., Jagusch, C., Sasse, F. & Schobert, R. Metal complexes of natural melophlins and their cytotoxic and antibiotic activities. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103: 72-76 (2009).

Diestel, R., Irschik, H., Jansen, R., Khalil, M.W., Reichenbach, H. & Sasse, F. Chivosazoles A and F, cytostatic macrolides from myxobacteria, interfere with actin. *ChemBioChem* 10: 2900-2903 (2009).

Schlenk, A., Diestel, R., Sasse, F. & Schobert, R. A selective 3-acylation of tetramic acids and the first synthesis of ravenic acid. *Chemistry - A European Journal* 16: 2599-2604 (2010).

### **Tagungsbeiträge**

Diestel, R., Sasse, F. & Frank, R.: Bioprofiling of small molecules by high-content analysis. (Poster) 15. 6<sup>th</sup> Status Seminar Chemical Biology, Frankfurt (2009).

Sasse, F., Diestel, R., Hinkelmann, B. & Frank, R.: A high-content analysis (HCA) bioprofiling platform for small molecules. (Poster). AIO – Symposium, Berlin (2009).

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Zellbiologischer Hintergrund</b> .....	<b>3</b>
1.1.1 Zellaufbau und Cytoskelett .....	3
1.1.2 Zellzyklus.....	5
1.1.3 Fluoreszenzmikroskopie .....	6
<b>1.2 Naturstoffe</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 In dieser Arbeit verwendete Naturstoffe</b> .....	<b>9</b>
1.3.1 3-Acyl-Tetramsäuren .....	9
1.3.2 Chivosazole und S522 .....	16
1.3.3 Prismatomerin, Plumericin, Isoplumericin .....	17
<b>1.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus</b> .....	<b>18</b>
<b>1.5 High-Content Analyse (HCA)</b> .....	<b>21</b>
1.5.1 Fortschritte in der Fluoreszenzmikroskopie.....	21
1.5.2 Beispielhafte Anwendungen der HCA .....	23
<b>1.6 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>25</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>26</b>
2.1.1 Geräte .....	26
2.1.2 Software .....	26
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	27
2.1.4 Chemikalien .....	27
2.1.5 Antikörper/Farbstoffe .....	27
2.1.6 Kulturmedien .....	28
2.1.7 Kits .....	28
2.1.8 Mikroorganismen und Zellkulturen .....	29
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>29</b>
2.2.1 Actin-(De)Polymerisation .....	29
2.2.2 Arbeiten mit Mikroorganismen .....	30
2.2.2.1 Handhabung .....	30
2.2.2.2 Agardiffusionstests .....	31



2.2.3	Arbeiten mit Zellkulturen .....	31
2.2.3.1	Kultivierung.....	31
2.2.3.2	Lagerung von Zellen .....	32
2.2.3.3	Proliferationstests .....	32
2.2.3.4	Affinität zur Effluxpumpe P-Glycoprotein.....	33
2.2.3.5	Fluoreszenzfärbungen .....	33
2.2.3.6	Zellzyklusanalysen.....	34
2.2.3.7	Caspase- und Mycoplasmentest.....	35
2.2.4	Automatische Mikroskopie – High-Content Analyse.....	35
2.2.4.1	Ausstattung.....	35
2.2.4.2	Akquise-Einstellungen .....	36
2.2.4.3	Bildanalyse: Software, Einstellungen und Hintergrund.....	38
2.2.4.4	Datenanalyse: Software, Einstellungen und Hintergrund .....	39
2.2.4.5	Etablierung der HCA.....	42
2.2.4.6	Referenzverbindungen.....	44
2.2.4.7	Tests der Antikörper/Farbstoffe.....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Biologische Wirkspektren der Naturstoffe und Naturstoffderivate .....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Tetramsäuren .....	47
3.1.1.1	Melophline .....	48
3.1.1.2	Raveninsäure-, Aburatubolactam- und Macrocidin-Fragmente .....	54
3.1.2	Chivosazole A und F, S522 .....	55
3.1.3	Prismatomerin, Plumericin, Isoplumericin .....	60
<b>3.2</b>	<b>High-Content Analyse .....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Etablierung/Optimierung .....	62
3.2.1.1	Entfernen der Flüssigkeiten aus den Wells .....	62
3.2.1.2	Zelllinie .....	63
3.2.1.3	Adhärenz der KB-3-1-Zellen .....	66
3.2.1.4	Zelldichte .....	67
3.2.1.5	Reduzierung des Randeffekts.....	68
3.2.1.6	Antikörper/Farbstoffe .....	70
3.2.1.7	Referenzsubstanzen.....	71
3.2.1.8	Optimiertes Protokoll der High-Content Analyse .....	73
3.2.2	Allgemeines zur Auswertung und Darstellung.....	73
3.2.3	HCA der Referenzsubstanzen .....	76
3.2.4	HCA der Naturstoffe .....	77

3.2.4.1	Tetramsäuren .....	78
3.2.4.2	Chivosazole, S522.....	82
3.2.4.3	Prismatomerin, Plumericin, Isoplumericin .....	83
3.2.5	HCA der Myxobakterien-Substanzsammlung.....	84
3.2.6	Weiterführende Versuche (auf HCA basierend) .....	89
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>94</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung der High-Content Analyse.....</b>	<b>94</b>
4.1.1	Die Zellen .....	94
4.1.2	Die Antikörper/Farbstoffe .....	95
4.1.3	Die Referenzverbindungen .....	96
4.1.4	Erstellen und Vergleichen der Profile: Die Analyse .....	97
<b>4.2</b>	<b>Biologische Wirkmechanismen der Naturstoffe .....</b>	<b>98</b>
4.2.1	Allgemeines zu den Standardtests.....	98
4.2.2	Tetramsäuren .....	99
4.2.2.1	Melophline .....	99
4.2.2.2	Raveninsäure .....	101
4.2.2.3	Aburatubolactam- und Macrocidin-Fragmente .....	101
4.2.3	Chivosazole A und F .....	102
4.2.4	S522 .....	103
4.2.5	Prismatomerin, Plumericin, Isoplumericin .....	104
<b>4.3</b>	<b>Substanzsammlung aus Myxobakterien .....</b>	<b>105</b>
<b>4.4</b>	<b>Zusammenfassender Ausblick für die HCA.....</b>	<b>105</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>117</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	117
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	119
6.3	Tabellenverzeichnis.....	121
	Danksagung.....	122

## Zusammenfassung

Viele Naturstoffe sind biologisch aktiv und finden in der Medizin und/oder als Hilfsmittel in der Forschung Verwendung. Dafür ist es essentiell, sie biologisch zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurden verschiedene Naturstoffe und Naturstoffderivate auf ihre biologischen Wirkungen hin untersucht. Dazu gehörten unterschiedliche Tetramsäuren, Iridoide aus Pflanzen und von Myxobakterien produzierte Substanzen, die zunächst bezüglich ihrer wachstumshemmenden Wirkung an mehreren Säugerzelllinien und Mikroorganismen untersucht wurden. In einigen Fällen wurden weitere Untersuchungen wie Fluoreszenzfärbungen, Tests zur Actin-Polymerisation oder Zellzyklusanalysen durchgeführt.

Als neuartige Methode zur Evaluierung von biologischen Wirkmechanismen konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich eine High-Content Analyse (HCA) etabliert werden. Bei dieser HCA wurden phänotypische Veränderungen von Zellen, die durch die biologisch aktiven Substanzen hervorgerufen werden, über automatisierte Mikroskopie und softwaregestützte Bildanalyse quantifiziert. Mithilfe verschiedener statistischer Methoden konnten die phänotypischen Profile neuer Verbindungen mit den Profilen von Substanzen mit bekannter Wirkung verglichen werden, um so Hinweise auf den Wirkmechanismus der neuen Verbindung zu gewinnen. Zu den für die HCA optimierten Parametern gehörten die Auswahl und Konzentrationsbestimmungen der Referenzsubstanzen sowie geeigneter Antikörper/Farbstoffe und die Optimierungen praktischer Abläufe. Es wurden verschiedene statistische Analysemethoden evaluiert und die Funktionalität der HCA an zahlreichen Beispielen gezeigt.

Zusammenfassende Ergebnisse aller Methoden zeigten als Wirkmechanismus für die von Myxobakterien produzierten Chivosazole A und F einen direkten inhibierenden Effekt auf die Actinfilamente. Für die Tetramsäuren ergaben sich eher heterogene Ergebnisse, für die Melophline konnten aber erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt werden. Sowohl für die ebenfalls aus Myxobakterien stammende Verbindung S522 als auch für die pflanzlichen Iridoide Prismatomerin, Plumericin und Isoplumericin konnten die in der HCA gewonnen Hinweise auf den Wirkmechanismus in ersten Folgeversuchen bestätigt werden. Mit der HCA steht ein neues Werkzeug bereit, um in Zukunft einzelne Verbindungen oder auch Substanzbanken charakterisieren zu können.

## Abstract

### *Biological characterisation of natural products and derivatives in special consideration of high-content analysis methods*

Numerous natural products are biologically active and thus are used as drugs and/or as tools in research. Therefore deeper knowledge about their mode of action is essential. Diverse natural products or derivatives thereof have been biologically characterised for this thesis. These substances comprise various tetramic acids, iridoids from plants, and myxobacterial compounds. First, their anti-proliferative activity has been determined, using several mammalian cell lines as well as micro-organisms. In some cases further examinations have been performed, including immunofluorescence, determination of actin polymerisation, and cell cycle analyses.

High-content analysis (HCA) is a new strategy that could be utilised to gain further insight into the mode of action of small molecules. Such a method was successfully established as presented in this thesis. The HCA is based on phenotypic changes in cells that are induced by the biologically active compounds. These changes are measured and quantified using automated microscopy and appropriate image-analysis tools. By means of different statistical methods, compounds with an already known mode of action can be compared to the new entities, revealing information about the mode of action of the latter. In order to establish the HCA several parameters had to be ascertained. A set of reference compounds and appropriate antibodies/probes have been chosen and their concentrations have been determined. The optimisation also included numerous experimental steps. Different statistical methods have been compared and the efficacy/functionality of the HCA was demonstrated.

Taking all results into consideration, a direct inhibitory effect on the actin filaments could be shown for the myxobacterial compounds chivosazole A and F. The examinations of the tetramic acids led to rather diverse results, although first structure-activity relations could be postulated for the melophlins. Moreover the HCA also revealed information about the mode of action of another myxobacterial substance S522 and the iridoids prismatomerin, plumericin and isoplumericin. Primary follow-up experiments proved these findings. The HCA is now available as a useful tool to characterise single substances or compound libraries.

# 1 Einleitung

## 1.1 Zellbiologischer Hintergrund

Der menschliche Organismus besteht aus  $10^{13}$  Zellen [Alberts et al., 2004], den Grundeinheiten des Lebens. Es gibt zahlreiche verschiedene Zelltypen, die über viele Kommunikationssysteme miteinander verbunden sind und auch intrazellulär gibt es unzählige Signalwege zur Weiterleitung von Informationen. Zellen reagieren häufig auf chemische Verbindungen, manche lösen komplexe Vorgänge in der Zelle aus. Diese intrazellulären Reaktionen auf „fremde“ Moleküle näher zu charakterisieren, stellt ein Arbeitsgebiet der zellbiologischen Forschung dar.

### 1.1.1 Zellaufbau und Cytoskelett

Tierische Zellen besitzen zahlreiche Zellorganellen oder Kompartimente, die durch Membranen voneinander getrennt sind und verschiedene Aufgaben erfüllen, wie in Abbildung 1-1 dargestellt.

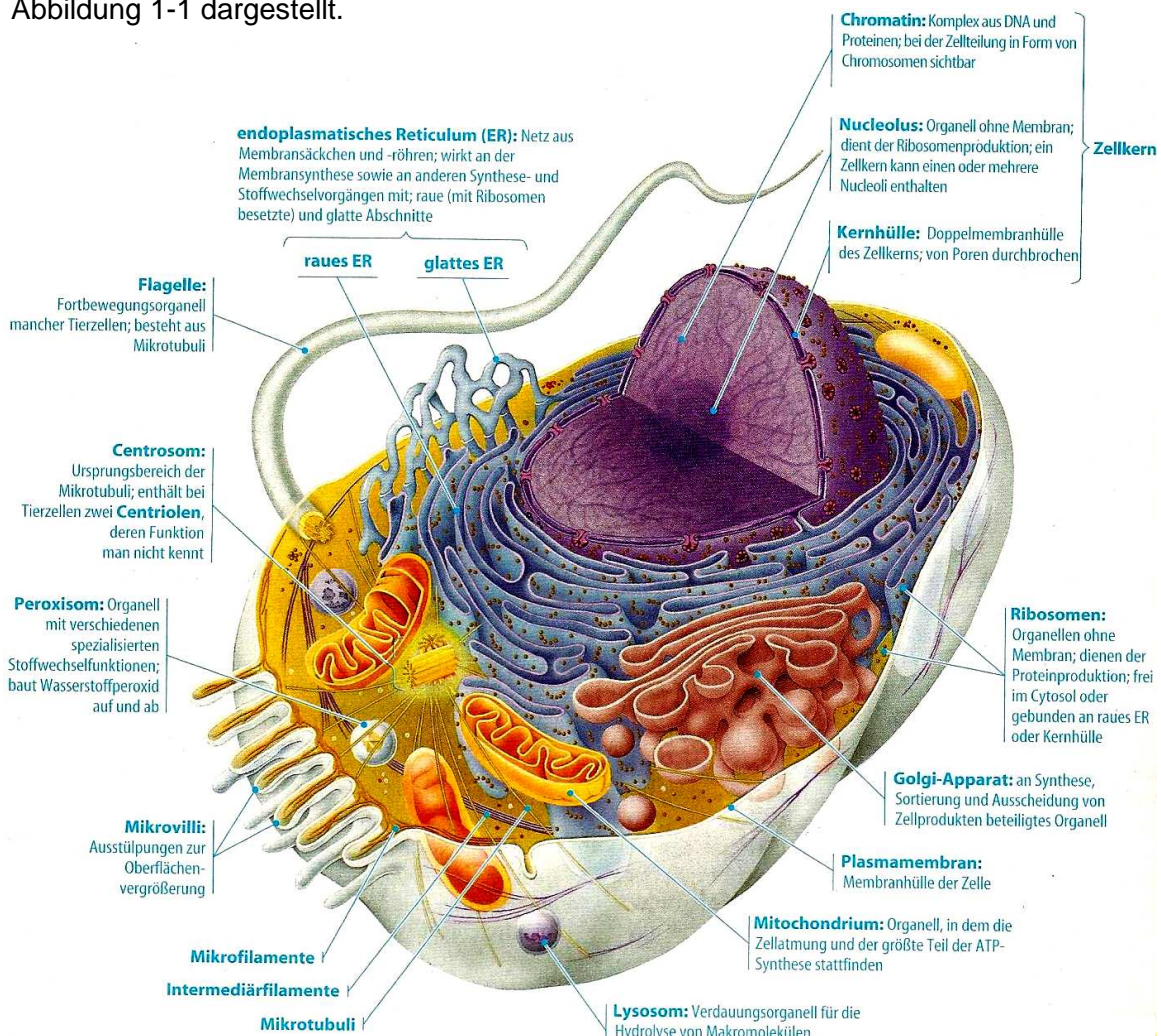
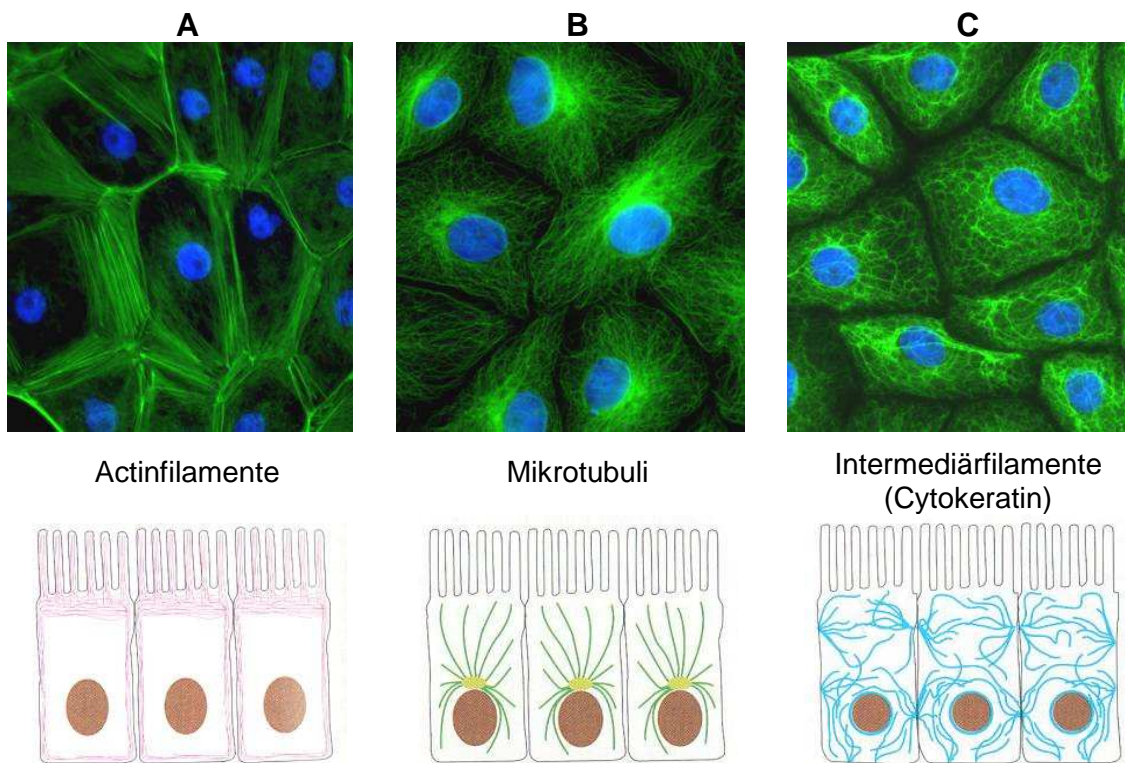


Abbildung 1-1: Überblick über eine tierische Zelle [nach Campbell & Reece, 2006]

Zusätzlich weisen eukaryotische Zellen ein Cytoskelett auf, das vielfältige Funktionen wahrnimmt und aus drei Filamenttypen besteht: Actinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Abbildung 1-2).



**Abbildung 1-2: Die drei Komponenten des Cytoskeletts**

*Mikroskopische Aufnahmen: Die Actinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente sind grün gefärbt, die Zellkerne blau.*

*Zeichnungen: Schematische Darstellung der drei Filamenttypen; die Zellkerne sind braun dargestellt [Alberts et al., 1994].*

Actinfilamente – oder Microfilamente – sind Polymere aus dem Protein Actin, die sich in einem ständigen Auf- und Abbau befinden. Ihre Aufgaben bestehen hauptsächlich darin, die Zelle in Form zu halten und die Wanderung (auch Migration genannt) von Zellen zu ermöglichen. Auch in Muskeln sind sie Teil des kontraktile Apparats. Außerdem sind sie noch am intrazellulären Transport und an der Bildung des kontraktile Ringes beteiligt, der während der Cytokinese zur Trennung der Zellen ausgebildet wird [Alberts et al., 2004; Lodish et al., 2008].

Ebenso wie die Actinfilamente sind auch die Mikrotubuli sehr dynamische Strukturen, die sich aus kleinen Protein-Untereinheiten zusammensetzen, den Heterodimeren aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin. Mikrotubuli sind für den intrazellulären Transport essentiell und

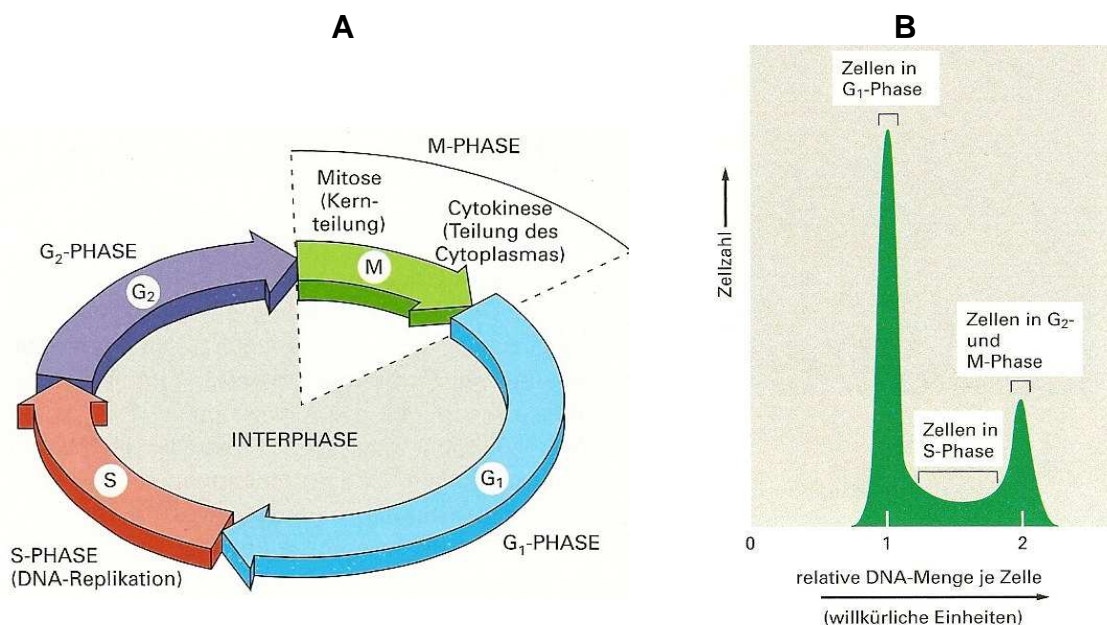


bestimmen die Lage der Kompartimente. Sie sind auch für die Trennung der Chromosomen während der Mitose von großer Bedeutung [Alberts et al., 2004].

Intermediärfilamente sind die variabelsten Komponenten des Cytoskeletts. In unterschiedlichen Zelltypen sind verschiedene Familien vorherrschend, z. B. die Keratin-Familie in Epithelzellen. Intermediärfilamente verleihen den Zellen mechanische Festigkeit, und in manchen Geweben verbinden sie die Zellen miteinander [Alberts et al., 2004; Plattner & Hentschel, 2006].

### 1.1.2 Zellzyklus

Absterbende Zellen müssen ersetzt werden, damit der Organismus weiterleben kann. Aus diesem Grund ist die Zellteilung für alle mehrzelligen Organismen lebensnotwendig. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei der Zellzyklus. Er lässt sich in vier Phasen unterteilen, wie in Abbildung 1-3 (A) dargestellt. In der S-Phase (Synthese) wird die DNA der Zelle verdoppelt, und in der M-Phase (Mitose) werden die Chromosomen getrennt und die Zellteilung findet statt. Die dazwischen liegenden G-Phasen (Gap = Lücke) verzögern den Prozess und ermöglichen so das Zellwachstum und die Kontrolle extra- und intrazellulärer Bedingungen.



**Abbildung 1-3: Der Zellzyklus [Alberts et al., 2004]**

(A) Die Phasen des Zellzyklus

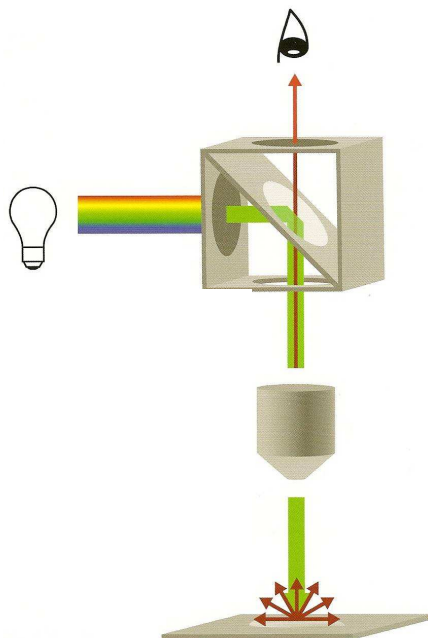
(B) Typisches Histogramm durchflusscytometrischer Bestimmungen des DNA-Gehalts

In Abbildung 1-3 (B) ist ein Histogramm abgebildet, wie man es bei typischen Zellzyklus-Experimenten erhält. Mithilfe eines Durchflusscytometers kann der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt werden (x-Achse). Die y-Achse repräsentiert die Anzahl der Zellen mit einem bestimmten DNA-Gehalt. Die Verdopplung der DNA lässt sich hier gut an den S-Phase-Zellen erkennen, deren relativer DNA-Gehalt zwischen 1 und 2 liegt. Veränderungen im Zellzyklus, z. B. durch äußere Einflüsse wie die Zugabe biologisch aktiver Verbindungen, lassen sich so detektieren [Alberts et al., 2004].

### 1.1.3 Fluoreszenzmikroskopie

Verschiedene Zellzyklusstadien einzelner Zellen können auch mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden, ebenso wie viele andere intrazelluläre Strukturen und Vorgänge. So sind z. B. die fotografischen Abbildungen der Cytoskelettstrukturen in Abbildung 1-2 mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden entstanden.

Ein Fluoreszenzmikroskop ähnelt einem normalen Lichtmikroskop, nutzt aber zusätzlich die Eigenschaft fluoreszierender Substanzen, Licht einer Wellenlänge zu absorbieren und energieärmeres, also langwelligeres Licht zu emittieren. Bei der Verwendung spezieller Filter können die für einen bestimmten Fluoreszenzfarbstoff benötigten Wellenlängen herausgefiltert werden.



Das Licht durchläuft dabei zwei Filter, wie in Abbildung 1-4 dargestellt. Den ersten Filter, den Exzitationsfilter, kann nur das benötigte Anregungslicht passieren (in der Abbildung grün dargestellt). Dieses gelangt dann auf das Objekt und die fluoreszierende Substanz. Nur das emittierte, langwelligere Licht (rot dargestellt) wird vom Emissionsfilter durchgelassen. Dadurch werden die gefärbten Strukturen als leuchtend wahrgenommen und heben sich vom restlichen Objekt ab [Alberts et al., 2004; Plattner & Hentschel, 2006; Baschong & Landmann, 2006].

**Abbildung 1-4: Schematische Darstellung  
des Strahlengangs im Fluoreszenzmikroskop**

[Baschong & Landmann, 2006]



## 1.2 Naturstoffe

Alle Rohstoffe, die sowohl aus der belebten als auch aus der unbelebten Natur stammen, können als Naturstoffe bezeichnet werden. Heute wird der Begriff Naturstoff allerdings eher für organische Verbindungen angewendet, die überwiegend im Sekundärstoffwechsel, im weiteren Sinne aber auch im Primärstoffwechsel von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren entstehen. Während die Primärstoffe nicht auf bestimmte Organismen als Produzenten begrenzt sind, ist dies für Sekundärstoffe hingegen meist der Fall. Über die Funktion oder ökologische Bedeutung vieler Sekundärmetabolite ist immer noch wenig bekannt. Für das Überleben des Individuums spielen sie meist keine große Rolle, für die Arterhaltung hingegen schon (z. B. als Pheromone) [Römpp, 2009]. Naturstoffe können beispielsweise nach ihrer chemischen Struktur gruppiert werden. Es gibt Amine, Flavonoide, Kohlenwasserstoffe, Terpene, Steroide, Alkaloide und andere [Habermehl et al., 2002]. Die meisten Naturstoffe bzw. ihre Strukturen sind aber auf nur wenige biochemische Synthesewege zurückzuführen, die von verschiedenen Organismen verwendet werden [Firn, 2010]. Produzenten der heute vom Menschen genutzten Naturstoffe sind hauptsächlich Bakterien, Pilze und höhere Pflanzen. Naturstoffe können aber auch aus anderen Mikroorganismen, marinen Organismen, Insekten und aus Vertebraten gewonnen werden [O'Keefe, 2001; Li & Vederas, 2009]. Heute sind ca. 200.000 verschiedene Naturstoffe bekannt, obwohl bisher nur etwa 5-15 % der höheren Pflanzen und nur ca. 1 % der mikrobiellen Welt untersucht werden konnten [Brahmachari, 2009].

Naturstoffe sind im Vergleich zu synthetischen Verbindungen oft biologisch wirksamer. Dies kann auf eine höhere strukturelle Vielfalt und Komplexität zurückgeführt werden. Naturstoffe sind aufgrund zahlreicher Chiralitätszentren häufig sterisch komplexer. Außerdem gibt es Unterschiede bei den Ringgrößen und -typen. Auch in der elementaren Zusammensetzung unterscheiden sich die beiden Gruppen; Naturstoffe haben oft weniger stickstoff- und schwefel-, dafür aber mehr sauerstoff- und kohlenstoffhaltige Gruppen. Außerdem ist ihr Molekulargewicht häufig größer und sie sind polarer (und dadurch besser wasserlöslich) [Koehn & Carter, 2005; Clardy & Walsh, 2004; Bode & Müller, 2005]. Dies sind nur einige Beispiele für chemische Unterschiede zwischen Naturstoffen und synthetischen Verbindungen.

Die Entstehung dieser komplexeren Strukturen in der Natur kann mit der natürlichen Selektion im Laufe der Entwicklung der Organismen begründet werden. So haben sich solche Organismen durchgesetzt, die mit geringem Aufwand eine hohe chemi-

sche Diversität generieren und erhalten können. Je vielfältiger und zahlreicher die Produkte sind, desto größer sind auch die Chancen, ein biologisch aktives Molekül zu produzieren. Dadurch sind viele Naturstoffe entstanden, die hocheffektiv an verschiedene Proteine binden und damit in verschiedene zelluläre Prozesse eingreifen [Koehn & Carter, 2005; Firn & Jones, 2003].

Die vielseitigen Eigenschaften der Naturstoffe machen sich die Menschen zunutze. Sie verwenden Naturstoffe in vielen Kulturen schon seit Jahrtausenden als Heilmittel, häufig in Form von Kräutern und Pflanzenextrakten. Auch heute noch spielen Naturstoffe eine große Rolle für unser Leben; sie sind Bestandteile vieler Genussmittel (z. B. Gewürze, Tabak, Kaffee), dienen der Forschung als unverzichtbare Werkzeuge zur Aufklärung biologischer Wirkprinzipien (z. B. der Kontrolle des Zellzyklus) und sind in der Medizin weit verbreitet [Firn, 2010; Kothari, 2007; Butler, 2004]. Von allen kleinen organischen Molekülen, die zwischen 1981 und 2002 weltweit als Medikamente auf den Markt gekommen sind, waren mit 49 % fast die Hälfte Naturstoffe, semi-synthetische Naturstoffanaloga oder auf Naturstoffen basierende Verbindungen [Newman et al., 2003]. Ihre Verwendung ist vielseitig, sie werden z. B. als Antibiotika, Antikrebsmittel, Antiparasitika und als Immunsuppressiva bei Organtransplantationen verwendet [Li & Vederas, 2009]. In der Literatur lassen sich zahlreiche Beispiele für Naturstoffe finden, die heute in der Medizin erfolgreich eingesetzt werden. Im Folgenden werden nur einige beispielhaft genannt. Penicillin, ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum, wurde 1928 als Produkt des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* entdeckt und bildete den Anfang der Ära der Antibiotika-Forschung [Prescott et al., 2002; Kothari, 2007; Bode & Müller, 2005]. Die Ära der Antikrebsmittel hingegen begann 1958 mit den zwei Alkaloiden Vinblastin und Vincristin, die aus dem Madagaskar-Immergrün isoliert wurden. Sie sind heute wichtige Antikrebsmittel, ebenso wie Paclitaxel, das 1971 identifiziert und charakterisiert werden konnte. Gewonnen aus der Pazifischen Eibe, wird Taxol, der Markenname von Paclitaxel, heute vor allem für die Behandlung von Brustkrebs verwendet [Butler & Newman, 2008; Firn, 2010]. Wie die zuletzt genannten Beispiele kommen die meisten der heute beschriebenen Naturstoffe aus Pflanzen. Es gibt aber auch zahlreiche wirksame Verbindungen, die ursprünglich aus Bakterien gewonnen wurden. Ein Beispiel dafür ist Epothilon, das in den 1980ern aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert wurde und seit 2007 als Antikrebsmittel unter dem Namen Ixempra auf dem Markt ist [Höfle, 2009].

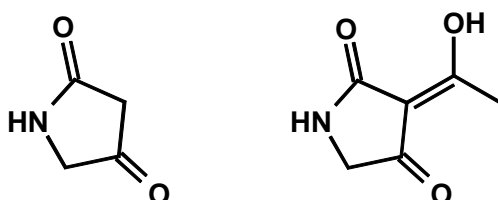
Auch viele der in dieser Arbeit untersuchten Naturstoffe werden von den gramnegativen, im Boden lebenden Myxobakterien produziert, die unter anderem für ihren außergewöhnlichen Lebenszyklus bekannt sind. Sie leben in Schwärmen mit komplexen interzellulären Kommunikationssystemen und können sogenannte Fruchtkörper ausbilden [Reichenbach & Höfle, 1999; Jensen et al., 2009]. Viele der von Myxobakterien produzierten Naturstoffe zeigen eine hohe biologische Aktivität. Dabei produzieren Stämme von *Sorangium cellulosum* etwa 50 % aller bekannten myxobakteriellen Naturstoffe [Rachid et al., 2009].

## 1.3 In dieser Arbeit verwendete Naturstoffe

Die für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Naturstoffe wurden von verschiedenen Kooperationspartnern synthetisiert oder isoliert oder entstammen internen Quellen des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung.

### 1.3.1 3-Acyl-Tetramsäuren

Obwohl Tetramsäuren schon länger bekannt waren, wurden sie erst in den 1960er Jahren als zentrale Struktureinheit zahlreicher Naturstoffe entdeckt. Die Sekundärmetabolite können aus verschiedenen Produzenten isoliert werden, vor allem aus marinen Organismen (Weichtiere, Schwämme, Cyanobakterien und andere Mikroorganismen), aber auch aus terrestrischen Mikroorganismen [Royles, 1995; Ghisalberti, 2003].



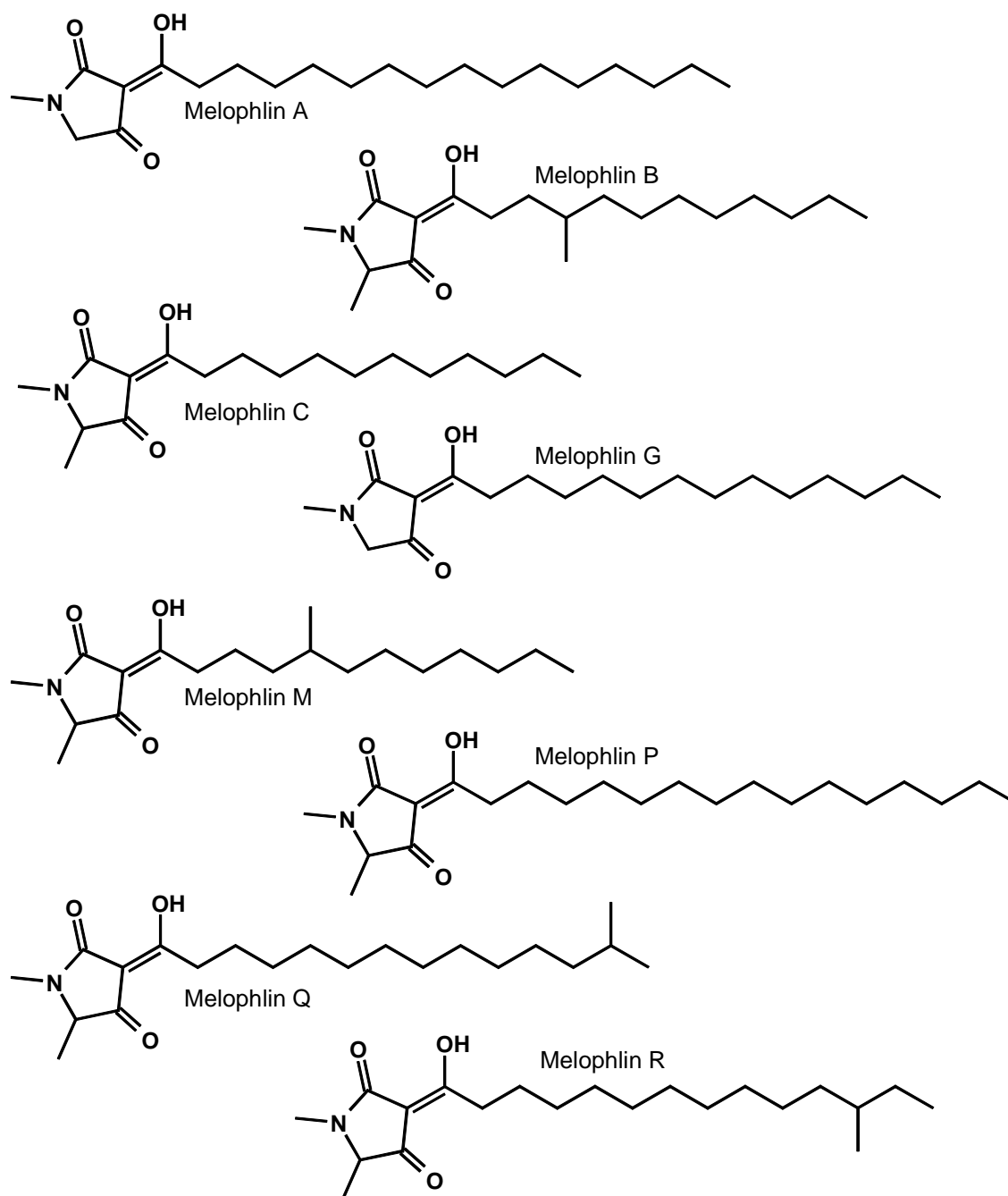
**Abbildung 1-5: Chemische Strukturen der Tetramsäure (2,4-Pyrrolidindion) und der 3-Acyltetramsäure**

Das Ringsystem der Tetramsäuren ist ein 2,4-Pyrrolidindion, das in den meisten Fällen am C3 acyliert vorliegt. Dabei ist die Acylgruppe sehr variabel, von der einfachen Acetylgruppe bis zu strukturell komplexeren Verbindungen mit mehreren Stereozentren. Das Wirkspektrum der tetramsäurehaltigen Naturstoffe ist sehr breit, z. B. antibiotisch, antiviral, cytotoxisch und antimykotisch, wobei 3-Acyl-Tetramsäuren meist pharmakologisch noch interessanter sind als nicht acylierte Tetramsäuren [Royles, 1995; Ghisalberti, 2003]. Dies wird zum einen meist damit erklärt, dass diese

Verbindungen Metallionen binden können. Zum anderen ist es möglich, dass sie, in Konkurrenz mit den Phosphatgruppen von Kinasen und Phosphatasen, an andere Moleküle binden und so die Wirkung der Enzyme inhibieren [Schobert, 2007].

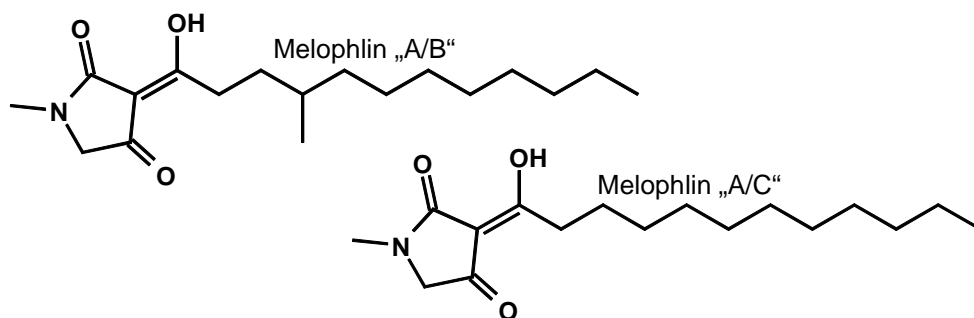
Bei den in dieser Arbeit detaillierter untersuchten Tetransäuren handelt es sich um verschiedene **Melophline** und die **Raveninsäure**. Ursprünglich waren noch weitere Verbindungen vorgesehen, welche von Projektpartnern synthetisch hergestellt werden sollten. Die Synthesen waren bei Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht beendet. Daher konnten lediglich Vorstufen der Synthesen (Fragmente) der macrocyclischen Verbindungen **Aburatubolactam** und **Macrocidin** untersucht werden.

Die **Melophline** sind relativ einfache 3-Acyl-Tetransäuren, die sich lediglich in ihren Substituenten am Kohlenstoffatom C5 (H oder CH<sub>3</sub>) und in der Länge und Verzweigung der Acyl-Seitenkette unterscheiden. Die Strukturen der freien Melophline, die in dieser Arbeit genauer untersucht wurden, sind in Abbildung 1-6 dargestellt.



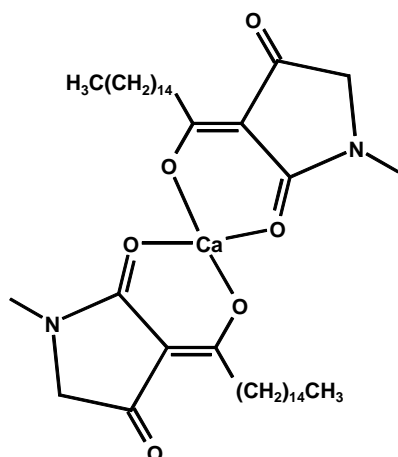
**Abbildung 1-6: Strukturen der natürlichen Melophline A, B, C, G, M, P, Q und R**

Zusätzlich wurden „neue“ Melophline synthetisiert, die wie Melophlin A und G keine Methylgruppe am C5 aufweisen und die Seitenketten von Melophlin B bzw. C besitzen: Melophlin „A/B“ und Melophlin „A/C“, in Abbildung 1-7 dargestellt.



**Abbildung 1-7: Strukturen der „neuen“ Melophline „A/B“ und „A/C“**

Zusätzlich lagen noch Chelatkomplexe einiger Melophline mit verschiedenen Ionen vor. Die Komplexbildung wird dabei über den C2-Carbonylsauerstoff und die Hydroxylgruppe der Seitenkette vermittelt. Ein Beispiel ist in Abbildung 1-8 dargestellt.

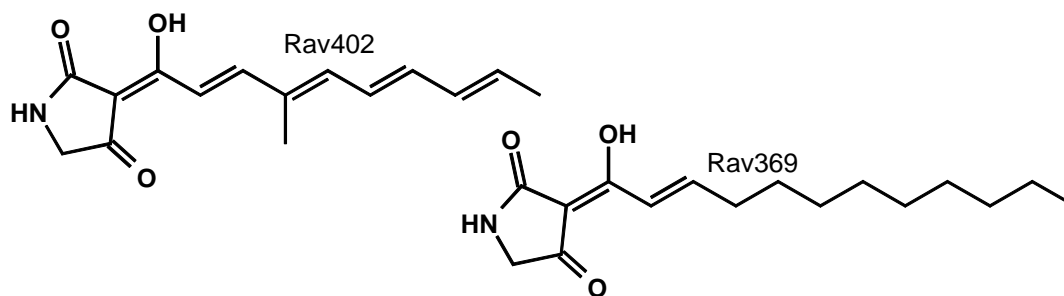


**Abbildung 1-8: Struktur des Calcium-Komplexes von Melophlin A**

Die ersten Melophline, A und B, wurden 2000 von Aoki et al. aus dem indonesischen Schwamm *Melophlus sarassinorum* isoliert. Im Jahr 2003 wurden 13 weitere Melophline beschrieben: Die Melophline C-O wurden ebenfalls aus dem Schwamm *Melophlus sarassinorum* extrahiert. Weitere drei Jahre später wurden auch die Melophline P-S aus einer Spezies der Gattung *Melophlus* isoliert [Aoki et al., 2000; Wang et al., 2003; Xu et al., 2006]. Es gibt Anzeichen dafür, dass oft nicht die marinen Organismen selbst die Sekundärmetabolite produzieren, sondern auf ihnen lebende Mikroorganismen [König et al., 2006]. Die große strukturelle Ähnlichkeit der Melophline zu Quorum sensing-Molekülen aus *Pseudomonas aeruginosa* unterstützt diese Hypothese [Kaufmann et al., 2005].

In der Literatur lassen sich zahlreiche Hinweise zur biologischen Aktivität der Melophline finden. Beispielsweise zeigten die Melophline A und B moderate cytotoxische Aktivität gegen die humane Leukämiezelllinie HL-60. Des Weiteren führten sie bei Mausfibroblasten, die durch eine Mutation im Ras-Gen transformiert waren, zu einer Reversion des Phänotyps. Außerdem wurde festgestellt, dass sie Mausfibroblasten in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren. Alle Aktivitäten lagen im einstelligen Mikromolar-Bereich [Aoki et al., 2000]. Den konkretesten Hinweis auf den Wirkmechanismus von Melophlin A gaben Knoth et al. [2009]. Sie konnten zeigen, dass die Verbindung einen inhibierenden Einfluss auf die Funktionsfähigkeit von Dynamin hat, einer cytosolischen GTPase, die am Abschluss der Vesikelbildung beteiligt ist [Alberts et al., 2004]. Die Melophline C, E, G, H, I, M, N und O zeigten hingegen keine Cytotoxizität gegen HL-60- oder HeLa-Zellen (Cervixkarzinom); Melophlin C war aber gegen einzelne Mikroorganismen aktiv (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*) [Wang et al., 2003]. Die Melophline P-S wiesen cytotoxische Wirkung gegen die murine Leukämiezelllinie L1210 mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0,9 bis 20 µM auf [Xu et al., 2006]. Weitere Untersuchungen zeigten keinen Einfluss der Melophline A, D, E, G, H, I, O, P, Q, R und S auf die Produktion des Cytokins Interleukin-8 in durch PMA (Phorbol-Myristate-Acetat) stimulierten HL-60-Zellen [Oda et al., 2007]. Es gibt noch weitere Publikationen, in denen von spezifischen Tests mit einigen Melophlinen berichtet wird. Strukturierte Untersuchungen mit allen oder zumindest einem Großteil der Melophline, anhand derer sich Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ableiten ließen, wurden jedoch bisher nicht durchgeführt. Die Melophline, die von unseren Projektpartnern synthetisch hergestellt wurden (A, B, C, G, M, P, Q, R), sollten in dieser Arbeit alle in uniformen Tests untersucht werden, z. B. auf ihre Aktivitäten gegen Standardsätze an Mikroorganismen und Zellkulturen. Das Aufstellen von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sollte so ermöglicht werden.

Bei der Suche nach neuen Antibiotika aus Pilzen fiel eine *Penicillium*-Spezies auf, die das Wachstum von methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) inhibierte. Als wirksame Verbindung wurde **Raveninsäure** gefunden. Der Name basiert auf dem Herkunftsort der Sammlung, aus der sie isoliert wurde: Ravensbourne National Park, Queensland, Australien [Michael et al., 2002].



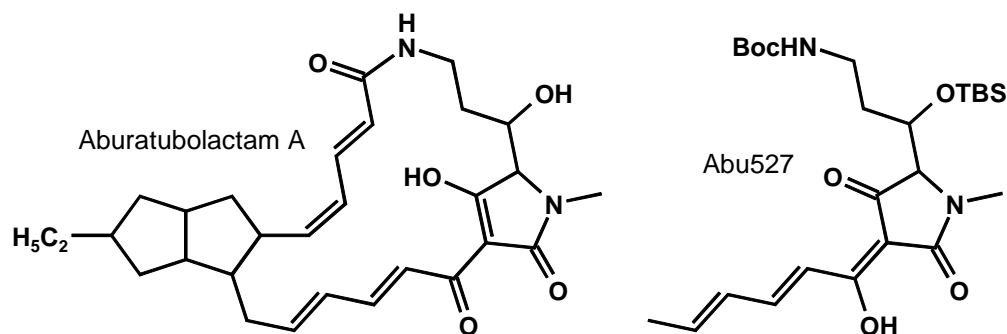
**Abbildung 1-9: Strukturen der Raveninsäure Rav402 und des Raveninsäure-Derivats Rav369**

Zusammen mit unseren Projektpartnern wurden Anfang 2010 die erste Totalsynthese sowie Ergebnisse zur biologischen Wirkung publiziert (u. a. weitere mikrobiologische Tests) [Schlenk et al.]. In der vorliegenden Arbeit wurden die reine Raveninsäure (Rav402) sowie das synthetische Raveninsäure-Derivat (Rav369) untersucht, beide in Abbildung 1-9 dargestellt.

**Aburatubolactam** A und C wurden aus einer Kultur von *Streptomyces* sp. isoliert, lebend auf marinen Mollusken in der Nähe von Aburatubo in Japan [Ghisalberti, 2003]. Sie gehören zur stetig wachsenden Familie der tetramsäurehaltigen Macrolactame, ebenso wie z. B. Cylindramid und Discodermid. Von Aburatubolactam A wurde berichtet, dass es die Bildung der Hyperoxid-Anionen in humanen Neutrophilen inhibiert [Bae et al., 1996]. 2008 konnte es von Henderson und Phillips totalsynthetisch hergestellt werden. Das komplette, heterocyclische Molekül Aburatubolactam A stand für diese Arbeit aber nicht zur Verfügung. Für Aburatubolactam C sind cytotoxische Effekte bei verschiedenen Krebszellen publiziert, basierend auf der Induktion von Apoptose und der damit einhergehenden DNA-Fragmentierung [Bae et al., 1996].

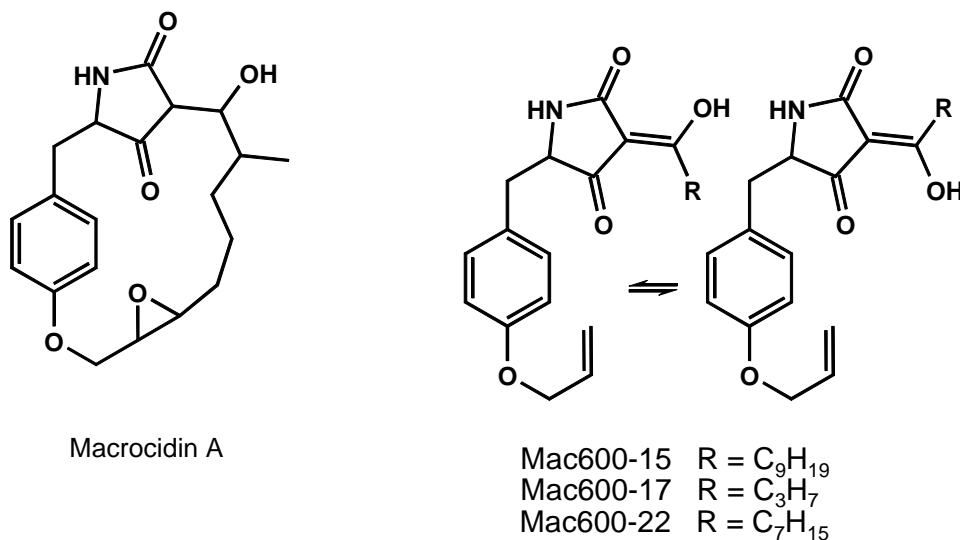
Das Aburatubolactam-Fragment, das für diese Arbeit zur Verfügung stand, sowie das komplette Aburatubolactam A sind in Abbildung 1-10 dargestellt.





**Abbildung 1-10: Chemische Strukturen von Aburatubolactam A und dem Fragment Abu527**

Die **Macrocidine** A und B wurden erstmals 2003 aus dem auf der Ackerdistel wachsenden Pilz *Phoma macrostoma* isoliert [Graupner et al., 2003]. Sie sind einzigartig unter den Tetransäuren, sowohl auf ihre Struktur als auch auf ihre bisher bekannte biologische Wirkung bezogen [Schobert & Schlenk, 2008].



**Abbildung 1-11: Chemische Strukturen von Macrocin A und den Fragmenten Mac600-15, -17 und -22**

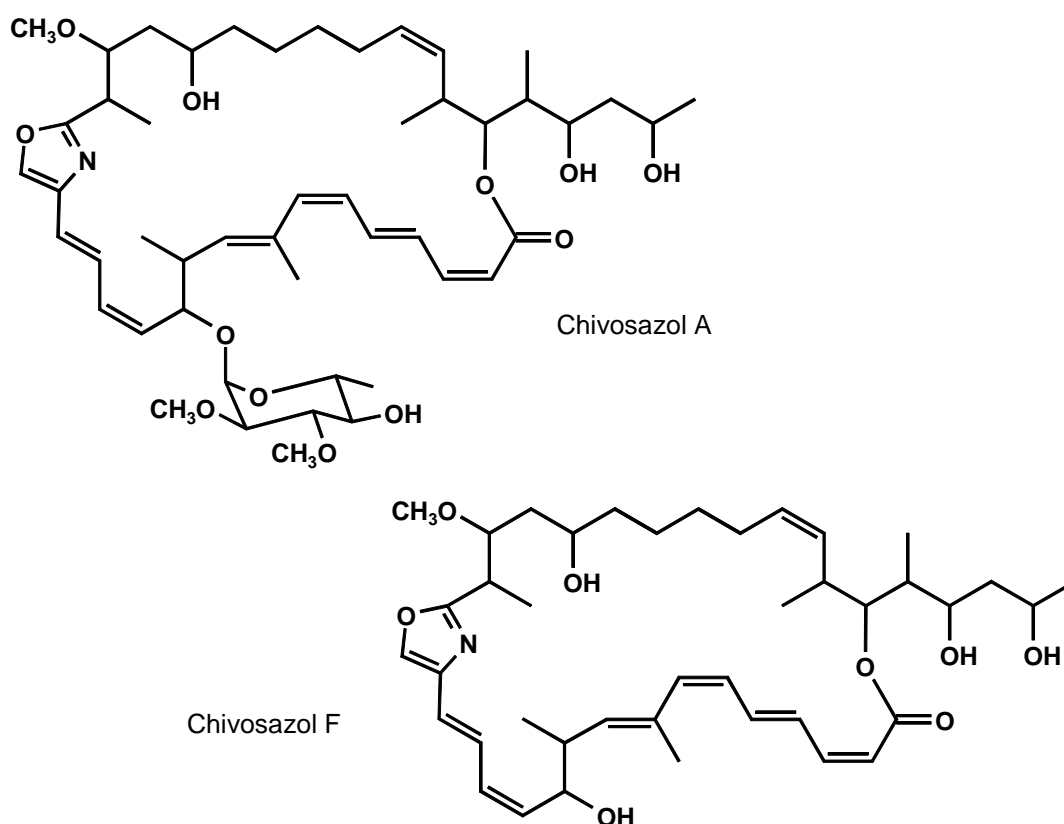
Die Macrocidine sind die ersten natürlichen 3-Acyltetransäuren, welche die Aminosäure Tyrosin als Teil ihres macrocyclischen Rings aufweisen, die die Struktur des Moleküls festigt. Sie zeigen selektive herbizide Eigenschaften, und zwar gegen zweikeimblättrige Arten, nicht aber gegen Gräser [Graupner et al., 2003]. Yoshinari et al.

veröffentlichten Anfang 2010 die erste Totalsynthese von Macrocidin A, welches aber, ebenso wie Aburatubolactam, für diese Arbeit nicht zur Verfügung stand. Lediglich die in Abbildung 1-11 dargestellten Synthese-Fragmente Mac600-15, Mac600-17 und Mac600-22 konnten in dieser Arbeit untersucht werden.

### 1.3.2 Chivosazole und S522

Von **Chivosazol** wurde erstmals 1995 von Irschik et al. berichtet. Diese Verbindung konnte, ebenso wie das bereits erwähnte Antikrebsmittel Epothilon, aus verschiedenen Stämmen des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* isoliert werden. Es handelt sich um einen 31-gliedrigen Macrocyclus, von dem antifungische und cytotoxische Aktivitäten publiziert waren; gegen Bakterien war die Verbindung jedoch nicht aktiv [Irschik et al., 1995; Jansen et al., 1997].

Die Chivosazole A und F wurden in dieser Arbeit genauer biologisch charakterisiert und die Ergebnisse größtenteils in Diestel et al. [2009] vorveröffentlicht. Die antiproliferative Wirkung auf verschiedene Zelllinien wurde detaillierter untersucht und es konnte ein polymerisationshemmender Effekt auf die Actinfilamente dafür verantwortlich gemacht werden.



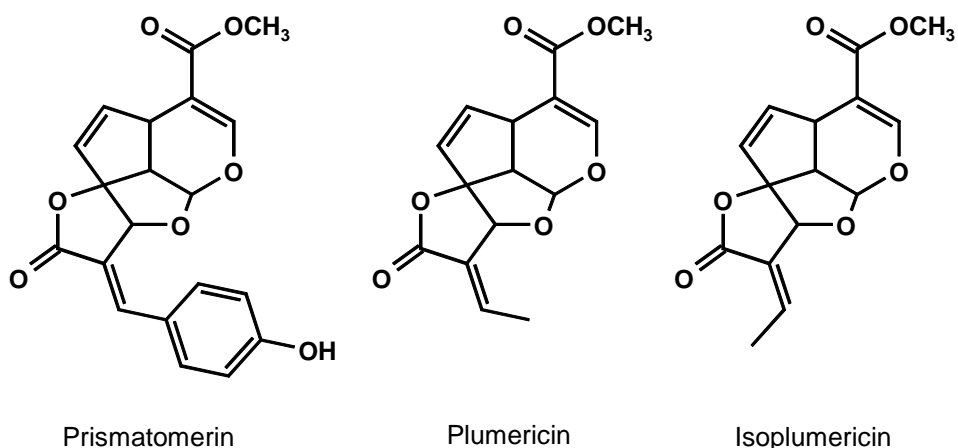
**Abbildung 1-12: Chemische Strukturen von Chivosazol A und Chivosazol F**

Bei der Verbindung **S522** handelt es sich um eine Teilstruktur eines ebenfalls aus Myxobakterien isolierten Polyketids. Aufgrund noch ausstehender Patentierungen sind aber sowohl die Struktur als auch der Name der Original-Verbindung proprietär.

### 1.3.3 Prismatomerin, Plumericin, Isoplumericin

**Prismatomerin** ist ein Iridoid, ein zu den cyclischen Monoterpenen gehörender sekundärer Pflanzenstoff [Römpf, 2009], der aus den Blättern von *Prismatomeris tetrandra* extrahiert und isoliert wurde [Krohn et al., 2007]. Dieser Strauch gehört zu der Familie der *Rubiaceae* (Rötegewächse) und wächst größtenteils im Hochland Südostasiens. Wurzel, Stamm und Blätter werden in verschiedenen Ländern in der Volksmedizin eingesetzt, z. B. gegen Schlangenbisse, für die Behandlung von Wunden und als Pfeilgifte [Chuakul et al., 2003].

Bei Untersuchungen der Wirkung von Prismatomerin auf 60 verschiedene humane Krebszelllinien am National Cancer Institute in den USA zeigte die Probe wachstumshemmende Effekte. Diese Wirkung war in Leukämiezellen am stärksten. Eine Inhibition des Wachstums um 50 % trat hier bereits bei einer Konzentration von < 10 nM auf. Bei den anderen Krebszelllinien waren diese Werte meist höher (< 10 nM bis 2 µM) [Krohn et al., 2007]. Anhand fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen von PtK2-Zellen (Nierenzellen aus dem Kaninchenkänguru) postulierten Krohn et al. [2007], dass Prismatomerin einen Effekt auf die Spindelformation mitotischer Zellen besitzt. Weitere Untersuchungen mit isolierten Mikrotubuli *in vitro* zeigten einen leicht fördernden Effekt von Prismatomerin auf die Polymerisation [persönliche Angaben von Dr. F. Sasse].



**Abbildung 1-13: Chemische Strukturen von Prismatomerin, Plumericin und Isoplumericin**

**Plumericin** und **Isoplumericin** sind Prismaticerin strukturell sehr ähnlich. Diese beiden Isomere weisen lediglich ein aromatisches Ringsystem weniger auf. Als Produzenten von Plumericin und Isoplumericin wurden mehrere Gattungen aus der Familie der *Apocynaceae* (Hundsgiftgewächse) gefunden, welche vor allem in den subtropischen und tropischen Regionen verbreitet sind. Besonders Arten aus der Gattung *Plumeria* (Frangipani) finden vielseitig Anwendung in der traditionellen Medizin verschiedener Völker [Abdel-Kader et al., 1997; Elsässer et al., 2005]. Die Verbindungen konnten z. B. aus dem Kernholz von *Plumeria rubra* extrahiert werden. Sie zeigen ein breites Spektrum an Aktivität. Es konnte u. a. gezeigt werden, dass sie sowohl cytotoxisch als auch antibakteriell, molluskizid, algizid und fungizid wirken [Hamburger et al., 1991; Elsässer et al., 2005; Wiart, 2006].

## 1.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus

Damit Naturstoffe und andere Moleküle in der Medizin oder als biochemische Werkzeuge in der Forschung Verwendung finden können, sollte möglichst viel über ihre Wirkmechanismen bekannt sein. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Verwendung der Verbindungen als Medikamente essentiell, denn durch eventuell vorhandene Bindung an mehrere Targets können Nebenwirkungen auftreten. Die biologische Charakterisierung ist kein einfacher Prozess, die Zahl möglicher Interaktionspartner ist groß. Nach Zhu et al. [2009] sind knapp 2000 Targets bereits bekannt, wobei hauptsächlich fünf Protein-Familien als Interaktionspartner für die Substanzen dienen: G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Kinasen, Proteasen, nucleäre Rezeptoren und Ionenkanäle [Inglese et al., 2007].

In vielen sogenannten „High-Throughput Screenings“ (HTS) oder Hochdurchsatzverfahren wird ein Target gewählt, und große Substanzsammlungen werden in kurzer Zeit auf ihre Interaktion mit diesem Target untersucht (bis zu 100.000 Verbindungen pro Tag). Um aber unbekannte Verbindungen auf ihren Wirkmechanismus hin zu untersuchen, sind eher Testsysteme geeignet, bei denen mehrere Parameter gleichzeitig gemessen werden können. Im Laufe der Zeit wurden dafür verschiedene Methoden entwickelt.

Zur Analyse auf Transkriptionsebene können z. B. DNA-Microarrays genutzt werden [Butte, 2002; Butcher & Schreiber, 2005]. Dabei dienen immobilisierte DNA-Sequenzen als Target und werden mit markierten Sonden hybridisiert, die den mRNA-Informationsgehalt der zu untersuchenden Zellen repräsentieren (cDNA oder RNA). Dadurch kann ermittelt werden, welchen Einfluss die Substanzen auf die Expression haben [Röder & Müller, 2004]. Ein Nachteil dieser Methode ist der niedrige Durchsatz.

Einen anderen Ansatz, ebenfalls auf der Transkription basierend, stellen Reporter-Gen-Assays (RGA) dar. Reportergene sind Gene oder Genfragmente, die an andere Gene gekoppelt werden oder diese ersetzen. Die Aktivität der gekoppelten oder ursprünglichen Gene kann so überprüft werden (z. B. durch Fluoreszenzsignale, die durch das Reportergen codiert sind) [Alberts et al., 2004]. Sehr viele RGA wurden schon etabliert und sind zum Teil auch kommerziell erhältlich. Ihre Signale sind meist sehr stabil und sie sind hochdurchsatzfähig. Verschiedene, parallel durchgeführte RGA können Hinweise auf den biologischen Wirkmechanismus von Substanzen geben. Ein Hauptkritikpunkt an RGA ist, dass die künstlich hergestellten Reporter nicht die endogene Regulation widerspiegeln [Feng et al., 2009].

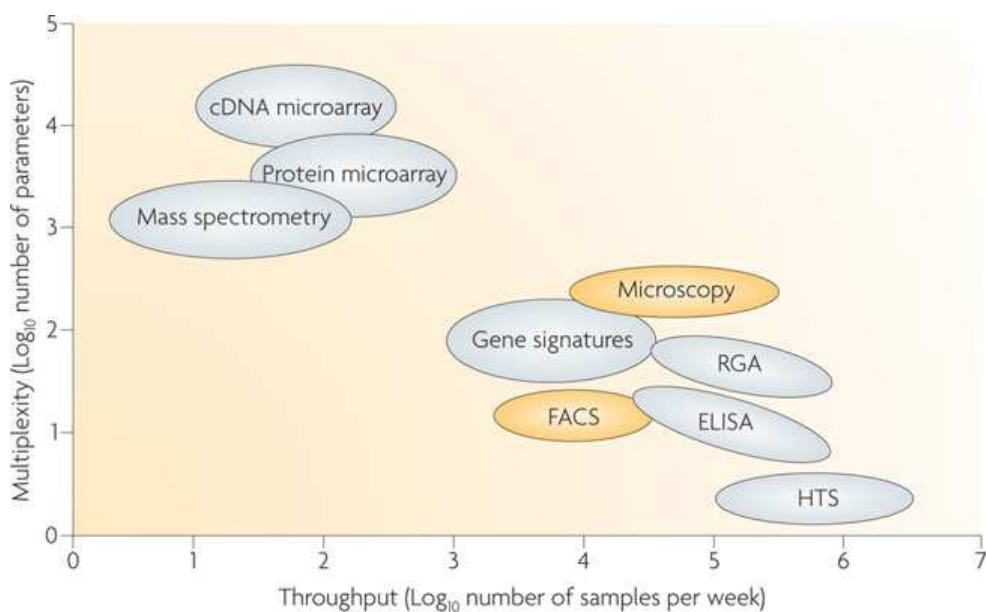
Eine Methode zur Untersuchung der Bindungspartner kleiner Moleküle auf Proteinebene sind Protein-Microarrays, die ähnlich wie DNA-Microarrays funktionieren, nur dass hier Proteine fixiert werden und als Proben z. B. kleine Moleküle verwendet werden, die allerdings markiert sein müssen [MacBeath & Schreiber, 2000].

Die Massenspektrometrie ist eine weitere Methode auf Protein-Ebene. Dabei werden Peptide anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses getrennt. Massenspektrometrische Methoden werden u. a. zur Bestimmung von Proteinmodifikationen durch unbekannte Proben eingesetzt [Ahram & Petricoin, 2008; Ramanathan & LeLacheur, 2009]. Nachteile der Protein-Massenspektrometrie sind unter anderem ein niedriger Durchsatz und hohe Instrumentenkosten [Feng et al., 2009].

Bei Untersuchungen der Wirkmechanismen unbekannter Proben verbreitet sich die Anwendung solcher Methoden immer mehr, die auf phänotypischen Veränderungen einzelner Zellen beruhen, da sie die Komplexität des lebenden Organismus genauer widerspiegeln als die bisher aufgeführten biochemischen Ansätze. Mithilfe zahlreicher kommerziell erhältlicher fluoreszenzmarkierter Antikörper und anderer Farbstoffe können verschiedene Strukturen in Zellen markiert werden, z. B. bestimmte Zellkompartimente oder cytosolische Proteine. Diese können sowohl per Durchflusszytometrie (auch FACS, fluorescence activated cell sorting) als auch per Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden [Krutzik et al., 2008; Feng et al., 2009]. Bei erstgenannter Methode passieren die Zellen in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl eine Lichtquelle. Dort werden sie einzeln mit Licht bestimmter Wellenlängen angeregt. Hierbei werden sowohl das Streulicht als auch die von den Fluorophoren emittierte Strahlung detektiert [Lang et al., 2006; Connally et al., 2009]. Bei der Fluoreszenzmikroskopie hingegen werden die markierten intrazellulären Strukturen durch Vergrößerung im Mikroskop sichtbar gemacht.

Die beiden Methoden unterscheiden sich z. B. in der Präferenz der verwendeten Zelllinien; für die Durchflusszytometrie sind Suspensionszellen besser geeignet, wohingegen für die Fluoreszenzmikroskopie adhärente Zellen verwendet werden. Andere Unterschiede liegen in der höheren Geschwindigkeit und der damit einhergehenden gesteigerten Durchsatzfähigkeit der Durchflusszytometrie. Bei der Mikroskopie können allerdings mehr Informationen aus den einzelnen Zellen gewonnen werden [Feng et al., 2009].

Um also schnell viele Proben biologisch charakterisieren zu können, wäre eine hochdurchsatzfähige Methode wünschenswert, bei der gleichzeitig zahlreiche Parameter gemessen werden können. In Abbildung 1-14 ist das Verhältnis der gemessenen Parameter zum Durchsatz bei verschiedenen Methoden dargestellt.



**Abbildung 1-14: Verhältnis messbarer Parameter zum Durchsatz verschiedener phänotypischer Untersuchungsmethoden**

[Feng et al., 2009]; x-Achse: Durchsatz (log<sub>10</sub> Proben pro Woche), y-Achse: Anzahl der messbaren Parameter (log<sub>10</sub>); genauere Beschreibung einiger Methoden im Text; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; gelbe Markierungen: phänotypbasierte Ansätze

Diese Abbildung verdeutlicht unter anderem, dass bei den Microarrays zwar viele Parameter, aber nur wenige Proben gleichzeitig vermessen werden können, wohingegen bei klassischen HTS-Ansätzen das Verhältnis genau umgekehrt ist. Die Mikroskopie stellt also eine optimale Methode dar, um bei phänotypischen

Untersuchungen trotz eines relativ hohen Durchsatzes viele Parameter gleichzeitig bestimmen zu können.

In dieser Arbeit sollte unter anderem eine auf Fluoreszenzmikroskopie basierende High-Content Analyse etabliert werden, auf die im folgenden Abschnitt detaillierter eingegangen wird.

## **1.5 High-Content Analyse (HCA)**

Wie in Abschnitt 1.4 erwähnt, werden phänotypbasierte Ansätze, im Folgenden auch Imaging-Verfahren genannt, unter anderem zur biologischen Charakterisierung unbekannter Proben immer häufiger angewendet. Hier können Effekte im Zusammenhang des komplexeren Systems „Zelle“ analysiert werden. Dies ist von Vorteil, denn die Tatsache, dass eine Substanz in einem biochemischen Test aktiv ist und z. B. an ein bestimmtes Protein bindet, heißt noch nicht, dass dies auch im lebenden Organismus zutrifft. Vor allem die Fluoreszenzmikroskopie spielt als Imaging-Verfahren schon länger eine große Rolle und hilft beim besseren Verständnis genereller Aspekte der Zellbiologie [Blake, 2001; Yarrow et al., 2003; Rausch, 2006; Lang et al., 2006].

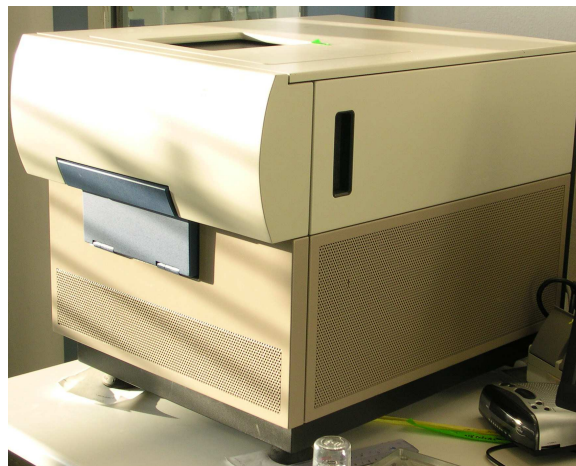
### **1.5.1 Fortschritte in der Fluoreszenzmikroskopie**

Lange Zeit mussten alle Schritte einer phänotypischen Untersuchung manuell durchgeführt werden, was dazu führte, dass nur eine geringe Anzahl an Experimenten mit nur wenigen Zellen und Proben pro Tag absolviert werden konnte. Daher kann, neben der Entwicklung von immer mehr fluoreszenzbasierten Farbstoffen, die Einführung der automatischen Mikroskopie hauptsächlich für den Fortschritt der Fluoreszenzmikroskopie verantwortlich gemacht werden [Giuliano et al., 2003].

Die Entwicklung immer spezifischerer und sensitiverer Farbstoffe, die an verschiedenste Proteine und Zellstrukturen binden, hat die Fluoreszenzmikroskopie entscheidend vorangebracht. Bei diesen Farbstoffen handelt es sich meist um fluoreszenzmarkierte Antikörper. Es können so intrazelluläre Strukturen sichtbar gemacht und Veränderungen verfolgt werden. Zahlreiche Farbstoffe sind kommerziell erhältlich und steigern damit natürlich auch die Anzahl möglicher Anwendungen. Häufig werden mehrere Komponenten gleichzeitig markiert, die durch die Anregung mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen sichtbar gemacht werden können [Blake, 2001; Yarrow et al., 2003; Lang et al., 2006; Giuliano, 2007]. Die Anzahl der verwendbaren Fluoreszenzkanäle bei fluoreszenzmikroskopischen Anwendungen ist meist aber auf drei bis vier limitiert, da sich die Spektren der Farbstoffe sonst zu sehr überschneiden [Blake, 2001].

Automatisierte Mikroskope erlauben die automatische Erstellung der Bilder von Objekten, die durch das Mikroskop vergrößert dargestellt werden. Zur Ausstattung gehört neben den Hardware-Komponenten (Filter, Objektive, Kamera usw.) auch die passende Software, die zur Steuerung des Geräts, vor allem aber für die Bildanalyse, die Darstellung der Ergebnisse und den Umgang mit großen Datenmengen benötigt wird [Giuliano et al., 2003; Starkuviene & Pepperkok, 2007].

Inzwischen bieten mehrere Firmen automatische Mikroskope an, z. B. Thermo Fisher Scientific, Evotec, Olympus, GE Healthcare, BD Biosciences und Molecular Devices [Lang et al., 2006; Starkuviene & Pepperkok, 2007; Johnston, 2008]. Für die vorliegende Dissertation stand ein ImageXpress Micro (IXM) von Molecular Devices zur Verfügung, in Abbildung 1-15 dargestellt.



**Abbildung 1-15: Das automatische Mikroskop ImageXpress Micro von Molecular Devices**

*Im Inneren des Geräts befinden sich unter anderem die Kamera, die Objektive und die Filter. Zur Ausstattung des Mikroskops gehören zusätzlich die externe Lichtquelle und der Anwendungs-PC (nicht abgebildet).*

Die beiden genannten Entwicklungen – Farbstoffe und automatische Mikroskopie – erlauben eine vereinfachte Durchführung, einen erhöhten Durchsatz und informationsreichere Analysen physiologischer Änderungen in Zellen und machen die so genannte High-Content Analyse (HCA) möglich, die 1997 von Cellomics eingeführt wurde [Giuliano et al., 1997; Taylor, 2007]. Im Gegensatz zum Hochdurchsatz-Ansatz geht es hier vielmehr um einen hohen Informationsgehalt (content) der Tests. Die HCA kann definiert werden als automatisches Imaging-Verfahren, um im physiologischen Zusammenhang auf zellulärer Ebene biologische Prozesse sowie Effekte von



Substanzen charakterisieren zu können. Dabei werden, meist in Mikrotiterplatten, die Morphologie einzelner Zellen oder Zellorganellen und komplexe Phänotypen durch Fluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht [Mitchison, 2005; Korn & Krausz, 2007; Keefer & Zock, 2008]. Die automatische Bildanalyse spielt dabei eine essentielle Rolle. Je nach Anwendung und Ziel des Ansatzes können zahlreiche Parameter oder sogenannte Deskriptoren bestimmt werden, z. B. Lokalisation von Objekten, Formen von Zellen und Proteinmodifikationen.

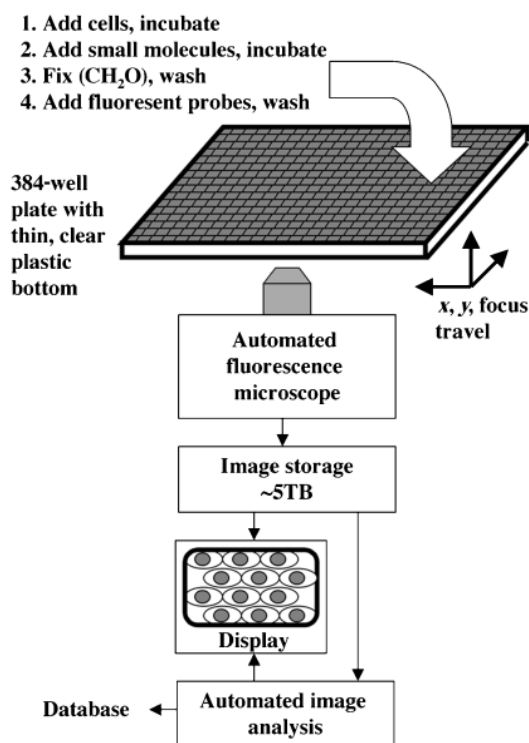
### **1.5.2 Beispielhafte Anwendungen der HCA**

Die Verwendung von High-Content Analysen hat in den letzten Jahren stark zugenommen, so dass sich zahlreiche Beispiele in der Literatur finden lassen.

Als beispielhafte Anwendung der HCA können Versuche in Verbindung mit RNAi (RNA interference) genannt werden. Dabei werden durch Bindung kleiner RNA-Stückchen an bestimmte Gensequenzen Gene ausgeschaltet. Auswirkungen auf den Phänotyp der Zellen können dann mithilfe der HCA bestimmt werden, wie Pelkmans et al. [2005] in einer wegweisenden Publikation zeigten [Rausch, 2006].

Die High-Content Analyse wird z. B. in Migrations-Experimenten verwendet. Zellmigration ist ein für viele Bereiche der Zellbiologie wichtiger Aspekt, so z. B. auch für die Bildung von Metastasen zur Ausbreitung von Tumoren. Yarrow et al. [2003] suchten daher nach Verbindungen, welche die Zellmigration stören. Dafür wurde in einer konfluenten Zellschicht durch Kratzen ein zellfreier Bereich geschaffen, in den die Zellen dann migrierten. Bei Zugabe verschiedener Proben konnte so ein möglicher Effekt auf die Migration mittels HCA gemessen werden.

Nach Mitchison [2005] laufen typische HCA-Experimente wie in Abbildung 1-16 dargestellt ab, hier gezeigt für Untersuchungen kleiner organischer Verbindungen.



**Abbildung 1-16: Ablauf eines typischen HCA-Experiments [Mitchison, 2005]**

Zellen werden in eine MTP-384 mit dünnem, durchsichtigen Plastikboden gegeben und kultiviert, damit sie adhären können. Die zu untersuchenden Proben werden zugegeben und es wird erneut inkubiert, typischerweise 1-24 h. Um die Zellproteine zu immobilisieren, wird eine Fixierung durchgeführt, meist mit Formaldehyd-Lösung. Anschließend werden die Zellen gefärbt. Danach werden mithilfe eines automatischen Mikroskops Bilder in den verschiedenen Wellenlängen erstellt und gespeichert. Mit automatischer Bildanalyse werden dann verschiedene Parameter gemessen, die den Zustand der Zellen beschreiben. Sowohl die Bilder als auch die Analysedaten werden in einer Datenbank gespeichert. Die anfallenden Datenmengen bei dieser Art an Versuchen sind sehr groß, deshalb werden Datenbanken mit hoher Kapazität benötigt (hier als Beispiel ~ 5 Terabyte).

Perlman et al. publizierten 2004 einen HCA-Ansatz, bei dem sie die Phänotypen von Zellen verglichen, die mit verschiedenen Substanzen behandelt wurden. Dafür wurden HeLa-Zellen mit 100 bekannten und unbekannten Proben in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und mehrere Zellkomponenten mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, darunter Transkriptionsfaktoren, phosphorylierte Kinasen und Cytoskelettstrukturen. Mithilfe eines automatischen Mikroskops wurden Bilder erstellt und bei der Bildanalyse für jede Probe zahlreiche Deskriptoren bestimmt, z. B. Größe und Form der Zellen, Intensitäten der Färbungen. Diese führten zu charakteristischen Profilen der Verbindungen, die dann miteinander verglichen werden konnten. In Clusteranalysen konnte gezeigt werden, dass bei den bekannten Verbindungen solche mit

ähnlichem Wirkmechanismus auch in einem Cluster zu finden waren. Durch vergleichende Analysen der Profile von Verbindungen, deren Wirkmechanismus bekannt ist, mit Profilen unbekannter Proben konnten letztere biologisch weiter charakterisiert werden.

Dieser Ansatz stellt also eine Möglichkeit dar, relativ schnell konkrete Hinweise auf den Wirkmechanismus neuer Proben zu bekommen und sollte daher in dieser Dissertation unter den vorhandenen Bedingungen etabliert werden.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Zwei ineinander greifende Hauptziele lagen dieser Arbeit zugrunde. Das eine war die biologische Charakterisierung ausgewählter Naturstoffe. Dies sollte unter anderem mithilfe der High-Content Analyse erreicht werden. Das zweite Hauptziel war, diese zu etablieren. Bei erfolgreicher Etablierung würde so auch das erste Ziel näher rücken.

Bei den zu untersuchenden Naturstoffen handelte es sich unter anderem um verschiedene 3-Acyl-Tetramsäuren. Hier sollten bei einer Untergruppe, den Melophlinen, auch Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufgestellt werden. Des Weiteren standen Chivosazol A und F, sowie die Verbindung S522, Prismatomerin, Plumericin und Iso-plumericin zur Verfügung.

Zur Charakterisierung der Naturstoffe sollten zunächst grundlegende Tests auf proliferationshemmende Wirkung mit verschiedenen Säugerzelllinien und Untersuchungen auf antibiotische Effekte mit einem breiten Spektrum von Mikroorganismen durchgeführt werden. In einzelnen Fällen sollten diese Versuche dann durch weitere Tests (Fluoreszenzfärbungen, Zellzyklusanalysen etc.) ergänzt werden.

Die Etablierung der HCA stellte einen wichtigen Teil der Arbeit dar. Wenn dies erfolgreich durchgeführt werden und die Funktionalität gezeigt werden könnte, sollten die ausgewählten Naturstoffe sowie zusätzlich eine Substanzsammlung mit mykobakteriellen Naturstoffen mit dieser Methode weiter untersucht werden, um Hinweise auf den Wirkmechanismus zu bekommen und erste Folgeversuche durchführen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Automatisches Mikroskop	ImageXpress Micro (Molecular Devices)
Bakterieninkubator	(Mettler)
Durchflusscytometer	FACSCalibur (Becton Dickinson)
Einkanal-Pipetten	Research und Reference (Eppendorf)
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan (Zeiss) mit Kamera AxioCam (Zeiss)
Lichtmikroskop	Axiovert 35 (Zeiss)
Mehrkanal-Pipetten	Transferpette electronic (Brand)
Multidispense-Pipette	Impact Multichannel (Thermo Fisher Scientific)
Photometer	NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies)
	UV-2401 (Shimadzu)
Pipettierhilfe	Pipetus-akku (Hirschmann Laborgeräte)
Pipettierroboter mit Pintool	Biomek FXP Laboratory Automation Workstation (Beckman Coulter)
Plattenmessgeräte	Victor 1420 Multilabel counter (Perkin Elmer)
	SpectraMax 250 (Molecular Devices)
Sterilwerkbänke	HBB2472S (Heraeus)
	SterilGARD III Advance (Baker Company)
Vakuumabsaugpumpe	Vacusaft comfort (Integra Biosciences)
Zählkammer	Neubauer improved (Assistent Germany)
Zellinkubator	CO2-Auto-Zero (Heraeus)
Zentrifugen	Biofuge A (Heraeus)
	5810R (Eppendorf)

#### 2.1.2 Software

AcuityXpress, AxioVision 3.1, C-Design 3.0, Cell Quest Pro 5.2.1, CorelCHART 5.0, MetaXpress, Microsoft Office 2003, ModFit LT 3.0, Origin 6.0, WinMDI 2.9

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von Becton Dickinson, Eppendorf, Greiner, Macherey-Nagel, Nunc, Thermo Fisher Scientific, TPP oder Roth bezogen, wenn nicht anders beschrieben. Bei den Mikrotiterplatten für die High-Content Analyse handelte es sich um CellBIND Surface Platten von Corning (durchsichtiger Boden, schwarz, Polystyren).

### 2.1.4 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Alexis Biochemicals, Bayer, Becton Dickinson, Fluka, Gibco, Invitrogen, J.T. Baker, Merck, Riedel-de Haën, Roche Diagnostics, Roth oder Sigma bezogen.

### 2.1.5 Antikörper/Farbstoffe

Alexa Fluor 488 Phalloidin	Invitrogen
Anillin Antibody (Kaninchen)	Bethyl Laboratories
Anti-Calmodulin (Maus)	Invitrogen
Anti-c-Fos (Kaninchen)	Sigma
Anti-phospho-CREB (Kaninchen)	Sigma
DAPI dihydrochloride	Sigma
GRP94 (Ratte)	Dianova
Monoclonal anti-p53, Clone BP53-12 (Maus)	Sigma
Monoclonal anti-Pan Cytokeratin, Clone C-11 (Maus)	Sigma
Monoclonal anti-Splicing Factor SC-35, Clone SC-35 (Maus)	Sigma
Monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulin, Clone B-5-1-2 (HCA), Clone DM1A (sonstige Färbungen) (Maus)	Sigma
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody (Kaninchen)	New England Biolabs
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Antibody (Maus)	New England Biolabs

#### Sekundäre Antikörper

Atto 488 anti-rabbit (Ziege)	Sigma
Alexa Fluor 488 anti-rat (Kaninchen)	Invitrogen
Atto 594 anti-mouse (Ziege)	Sigma

### 2.1.6 Kulturmedien

Für alle Bakterien wurde EBS-Medium und für die Hefen sowie die Hyphenpilze Medium 90 verwendet. Alle Medienbestandteile stammten von Becton Dickinson, Fluka, Merck, Roth oder Sigma.

EBS (pH 7,0):

- Pepton (5 g/l)
- Proteosepepton (5 g/l)
- Fleischextrakt (1 g/l)
- Hefeextrakt (1 g/l)
- HEPES (10 g/l)

90 (pH 5,6):

- Malzextrakt (30 g/l)
- Pepton (3 g/l)

Für die Agarmedien (Agardiffusionstests) wurden 15 g/l Agar zugegeben. Die Medien wurden mit dest. H<sub>2</sub>O angesetzt und sofort autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Die verwendeten Zellkulturmedien sind in Tabelle 2-1 aufgelistet. Die Medien wurden ebenfalls bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 2-1: Verwendete Medien für die verschiedenen Zelllinien**

Zelllinie	Medium	Hersteller	Zugabe
A-498, PtK2	MEM	Gibco	- 1x Non-essential amino acids (Gibco) - 1x GlutaMAX (Gibco) - 10 % FBS (Lonza)
A-549, L-929, KB-3-1, KB-V1	DMEM	Lonza	10 % FBS (Lonza)
U-937	RPMI 1640	Gibco	10 % FBS (Gibco)
HMVEC, HUVEC	EBM-2	Lonza	(zusätzlicher Packungsinhalt)

### 2.1.7 Kits

MycoAlert® Assay Control Set	Lonza
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza
Actin Polymerization Biochem Kit	Cytoskeleton
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega

## 2.1.8 Mikroorganismen und Zellkulturen

**Tabelle 2-2: Verwendete Mikroorganismen**

Mikroorganismus	Abkürzung	Quelle	
<i>Escherichia coli</i> tolC	TolC	Ciba-Geigy AG, Basel	gramnegative Bakterien
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kbp	HZI-Sammlung	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Psa	ATCC 9027	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sta	HZI-Sammlung	grampositive Bakterien
<i>Micrococcus luteus</i>	Mcl	HZI-Sammlung	
<i>Mycobacterium phlei</i>	Myp	HZI-Sammlung	
<i>Candida albicans</i>	Caa	DSM 1386	Hefen
<i>Hansenula anomala</i>	Hna	DSM 70263	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	Scs	Euroscarf	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Asf	HZI-Sammlung	Hyphenpilze
<i>Aspergillus niger</i>	Asn	DSM 823	
<i>Botrytis cinerea</i>	Boc	DSM 877	
<i>Pythium debaryanum</i>	Pyd	DSM 62946	

**Tabelle 2-3: Verwendete Zelllinien**

Ursprung				
Zelllinie	Quelle	Spezies	Gewebe	Morphologie
A-498	DSMZ ACC55	Mensch	Nierenkrebs	Epithel
A-549	DSMZ ACC107	Mensch	Lungenkarzinom	Epithel
HMVEC	Schering	Mensch	Vorhaut	Endothel
HUVEC	Lonza	Mensch	Nabelschnurvene	Endothel
KB-3-1	DSMZ ACC158	Mensch	Cervixkarzinom	Epithel
KB-V1	DSMZ ACC149	Mensch	Cervixkarzinom	Epithel
L-929	DSMZ ACC2	Maus	Bindegewebe	Fibroblasten
PtK2	ATCC CCL-56	Kaninchenkänguru	Niere	Epithel
U-937	DSMZ ACC5	Mensch	Lymphom	Monozytär

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Actin-(De)Polymerisation

*In vitro* Actin-(De)Polymerisationsversuche wurden mithilfe des Actin Polymerization Biochem Kits von Cytoskeleton durchgeführt. Der Polymerisationspuffer, das ATP und

der G-Puffer wurden nach Angaben des Herstellers behandelt und angesetzt. 1 mg des Actins wurde in 50 µl deionisiertem Wasser resuspendiert und mit 4840 µl G-Puffer auf 0,2 mg/ml verdünnt und 1 h zum Depolymerisieren auf Eis gelagert. Anschließend wurde das G-Actin 30 min bei 4 °C und 40 00 rpm (3220 x g) zentrifugiert. Der Versuch wurde dann mit den Melophlinen in einer MTP-96 durchgeführt, die anderen Polymerisationstests wurden in Mikrotiterplatten mit 384 Wells durchgeführt. Letztere Ansätze werden im Folgenden beschrieben, die Tests in der MTP-96 wurden genauso durchgeführt, lediglich mit den vierfachen Volumina. 50 µl G-Actin wurden in jedes Well gegeben, 50 µl G-Puffer dienten als Kontrolle und wurden später für die Auswertung von den Brutto-Werten abgezogen (Hintergrund). Je 5 µl der Proben, in G-Puffer vorverdünnt, wurden dann zum G-Actin gegeben und die Platten sofort am Fluoreszenz-Messgerät bei 405 nm vermessen. Die Messungen erfolgten für mindestens 20 min in Abständen von 1-2 min. Dann wurden der Polymerisationspuffer zugegeben (5 µl) und weitere Messungen in immer größeren Abständen so lange durchgeführt, bis sich keine oder nur noch minimale Anstiege in der Fluoreszenzintensität feststellen ließen. Die finale Konzentration des Actins lag nach Zugabe der Proben und des Polymerisationspuffers bei 0,17 mg/ml (statt 0,40 mg/ml nach Herstellerangaben).

Für die Depolymerisationstests wurde das Actin (1 mg/ml) in G-Puffer angesetzt. Anschließend wurden 25 µl Polymerisationspuffer zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur polymerisiert. Das F-Actin wurde dann mit 4 ml G-Puffer auf 0,2 mg/ml verdünnt, 50 µl in jedes Well pipettiert und je 5 µl der Proben zugegeben. Die anschließenden Messungen wurden ca. 2 h in größer werdenden Abständen durchgeführt.

## **2.2.2 Arbeiten mit Mikroorganismen**

### **2.2.2.1 Handhabung**

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Bakterien und Hefen wurden nicht permanent in Kultur gehalten, sondern in Kultur gebracht, wenn sie benötigt wurden. Von allen Organismen, bis auf *Saccharomyces cerevisiae*, wurden Gefrierkulturen bei -20 °C gelagert. Der verwendete Stamm von *S. cerevisiae* wurde auf einer Agarplatte gehalten. Bei Bedarf wurde davon eine neue Schüttellkultur gestartet. Von den Hyphenpilzen wurden Konidiensuspensionen bei 4 °C gelagert.

Um die Bakterien und Hefen zu starten, wurde eine Gefrierkultur in frisches Medium gegeben und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die OD bei 600 nm mithilfe eines Photometers bestimmt.



### **2.2.2.2 Agardiffusionstests**

Für die Agardiffusionstests wurden Vollmedien verwendet. Für die Bakterien wurde EBS verwendet, für die Hefen und Hyphenpilze 90-Medium. Das Medium (mit Agar) wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis der Agar geschmolzen war und dann im Wasserbad auf 50 °C gekühlt. Die Mikroorganismen wurden so in das Medium gegeben, dass eine End-OD von 0,01 bei den Bakterien und von 0,1 bei den Hefen vorlag. Die Konidien suspension der Hyphenpilze wurden 1:100 im Medium verdünnt. Von den so angeimpften Medien wurden jeweils 15 ml luftblasenfrei in eine sterile Petrischale pipettiert und unter der sterilen Werkbank abgekühlt. Eine längere Lagerung (max. 2 Wochen) erfolgte dann bei 4 °C.

Je 20 µl Probe wurden auf ein Filterblättchen (6 mm Durchmesser) pipettiert und diese dann unter der sterilen Werkbank offen auf einer sterilen Glasscheibe getrocknet, bis das Lösemittel vollständig verdampft war. Danach wurden die Blättchen mithilfe einer Pinzette auf das feste Agarmedium mit den Mikroorganismen gelegt. Die fertigen Petrischalen wurden dann im Bakterieninkubator bei 30 °C für 1-2 Tage inkubiert, je nach Geschwindigkeit des Wachstums (Hyphenpilze meist 2 d, Bakterien nur 1 d). Der Durchmesser der Hemmhöfe wurde dann vermessen.

## **2.2.3 Arbeiten mit Zellkulturen**

### **2.2.3.1 Kultivierung**

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für alle Zellkulturarbeiten wurden die benötigten Medien vor Arbeitsbeginn auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> im Inkubator unter Wasserdampfsättigung in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Volumen der Medien richtete sich dabei nach der Größe der Zellkulturflaschen, 10 ml bei 25 cm<sup>2</sup>- und 30 ml bei 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen. Die adhären ten Zellen wurden subkonfluent (~ 80-90% Konfluenz) geerntet und passagiert. Dazu wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden des Gefäßes gekratzt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer sterilen Einmalplastikpipette durchmischt und vereinzelt. Eine Ausnahme bildeten die KB-V1-Zellen, welche für die Ernte trypsiniert wurden (siehe S. 32). Anschließend wurde ein Aliquot in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Bei der Suspensionzelllinie U-937 wurde eine Subkultivierung durchgeführt, sobald sich die Farbe des Mediums von rötlich nach gelb veränderte (Neutralrot als pH-Indikator im Medium). Die Verdünnung richtete sich bei allen verwendeten Zelllinien nach der jeweiligen Wachstumsrate und lag bei 1:5 bis 1:100, so dass alle Zelllinien nur 1x wöchentlich subkultiviert werden mussten.

Bei den KB-V1-Zellen handelte es sich um eine Tochterzelllinie der KB-3-1, bei der die Effluxpumpe P-Glycoprotein überexprimiert war. Um diesen Zustand zu erhalten, wurde bei jeder Subkultivierung 1 µg/ml Vinblastin zugegeben.

*Trypsinierung:* Zum Vereinzeln der Zellen (vor dem Auszählen und für empfindlichere Zelllinien wie KB-V1) wurden die Zellen trypsinisiert, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml sterilem EBSS gewaschen, 1 ml Trypsin-Lösung mehrmals über den gesamten Flaschenboden gegeben und bis auf einen dünnen Film wieder abgezogen. Die Inkubationszeit variierte zwischen den unterschiedlichen Zelllinien von 2 bis 25 min (L-929 bzw. A-498). Der Prozess des Ablösens wurde in einigen Fällen durch Klopfen gegen die Zellkulturflasche mechanisch beschleunigt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Wenn nötig wurden die Zellen mithilfe einer Neubauerzählkammer gezählt.

Alle Zelllinien wurden maximal 1 Jahr in Kultur gehalten. Sie wurden dann entsorgt und aus einer Kryokonserven neu gestartet. Alle Zellkulturen wurden halbjährlich mithilfe des MycoAlert® Detection Kits auf Mycoplasmen getestet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, lediglich adaptiert auf MTP-384 mit einem Viertel der angegebenen Volumina.

### **2.2.3.2 Lagerung von Zellen**

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen wie für die Subkultivierung angegeben geerntet. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation (3000 rpm, 3 min) pelletiert und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Lagerung erfolgte in Kryoröhrchen bei -70 °C für mindestens 24 h und dann dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Zum Reaktivieren einer Kryokonserven wurden die Zellen schnell bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Nach spätestens einem Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt, um das DMSO des Einfriermediums vollständig zu entfernen.

### **2.2.3.3 Proliferationstests**

Für die Proliferationstests wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt und mit 5000 Zellen/Well (in 120 µl) in die Reihen B-G einer MTP-96 gegeben; die Reihen A und H wurden nur mit Medium befüllt. In eine andere MTP-96 wurden in jedes Well 100 µl Medium gegeben und in Spalte 1 zusätzlich 50 µl der Probe (zwei Proben in Doppelbestimmung und Lösemittelkontrolle). Es erfolgte eine serielle Verdünnung mit

50 µl (Verdünnung 1:3) von links nach rechts. Aus dieser Probenplatte wurden dann je 60 µl in die gleichen Wells der ersten Mikrotiterplatte (mit den Zellen) transferiert. Nach einer 5-tägigen Inkubation wurde bei allen adhärenenten Zelllinien ein MTT-Test, bei der Suspensionszelllinie U-937 ein WST-Test durchgeführt.

Der MTT-Test erfolgte mit leichten Veränderungen nach Mosmann [1983]. Es wurden 20 µl MTT-Lösung (5 mg/ml) in jedes Well gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit PBS gewaschen und 100 µl eines Iso-propanol-HCl-Gemisches (100 ml 2-Propan mit 400 µl konz. HCl) gelöst und photometrisch bei 595 nm in einem Plattenphotometer vermessen.

Beim WST-Test der U-937-Zellen wurden 10 µl WST-Lösung (WST-1 von Roche, ohne Konzentrationsangaben) in jedes Well gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung bei 450 nm am Plattenphotometer.

Die Ergebnisse wurden mit Excel dargestellt und die Konzentration, bei der 50 % der Zellproliferation inhibiert waren, als  $IC_{50}$ -Wert verwendet (für den  $IC_{90}$ -Wert entsprechend bei 90 % inhibiertem Wachstum).

#### **2.2.3.4 Affinität zur Effluxpumpe P-Glycoprotein**

Zur Bestimmung der Affinität der zu untersuchenden Probe zur Effluxpumpe P-Glycoprotein wurden, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben, zwei parallele Proliferationstests mit KB-V1-Zellen angesetzt. Zu der Zellsuspension einer Platte wurde Verapamil mit einer endgültigen Konzentration von 5 µg/ml gegeben. Die andere MTP erhielt keine Zusätze. Die Platten wurden wie oben beschrieben inkubiert und ausgewertet. Der Faktor  $IC_{50} \text{ ohne Verapamil} : IC_{50} \text{ mit Verapamil}$  gibt die Affinität der Proben zu P-Glycoprotein an.

#### **2.2.3.5 Fluoreszenzfärbungen**

*Zellaussaat:* Für die Fluoreszenzfärbungen, deren Aufnahme nicht am automatischen Mikroskop erfolgte, wurden Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Zunächst wurde dazu je ein steriles Deckgläschen mit einem Durchmesser von 13 mm in ein Well einer Mikrotiterplatte mit vier Wells gegeben. PtK2-Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflaschen abgeschabt und 750 µl der Zellsuspension in jedes Well gegeben. Anschließend wurden die Zellen über Nacht inkubiert, um eine vollständige Adhärenz zu gewährleisten. Die Proben wurden zugegeben, bevor die Zellen Konfluenz erreichten, wobei stets darauf geachtet wurde, dass die Konzentration des Lösemittels bei MeOH

1% und bei DMSO 0,1 % nicht überschritt. Die Zellen wurden mit den Proben, je nach Versuchsansatz unterschiedlich lange, weiter bei 37 °C inkubiert.

*Fixierung:* Nach der Inkubation wurden die Zellen vor einer Färbung der Actinfilamente (mit Phalloidin) mit Formalin fixiert, vor allen anderen Färbungen mit MeOH/Aceton. Für alle Schritte der Fixierungen wurden 500 µl/Well verwendet. Für die Formalin-Fixierung wurden die Zellen mit 3,7 % Formalin für 10 min fixiert und anschließend für 5 min mit 0,1 % Triton X-100 behandelt. Bei der MeOH-Fixierung wurde für 10 min mit eiskaltem MeOH/Aceton (1:1) fixiert. Bei der Behandlung mit Formalin werden die Proteine vernetzt und dadurch schonender fixiert als bei einer MeOH-Behandlung, bei der die Proteine präzipitieren. Bei der Aceton-Behandlung, die gleichzeitig mit der MeOH-Fixierung stattfand, wurden die Zellen permeabilisiert, so dass die Antikörper/Farbstoffe auch ins Innere der Zellen gelangen konnten. Nach der Formalin-Fixierung mussten die Zellen noch mit Triton X-100 behandelt werden, um sie zugänglich für die Antikörper/Farbstoffe zu machen. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

*Färbung:* Für die Färbungen wurden die entsprechenden Antikörper/Farbstoffe verdünnt. Diese Verdünnungen waren empirisch (aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe übernommen) und lagen für Phalloidin und GRP94 bei 1:100, für anti-Tubulin bei 1:500 und für alle sekundären Antikörper bei 1:100 oder 1:200. Die Verdünnungen wurden in PBS mit 10 % FBS angesetzt. DAPI wurde auf 1 µg/ml in PBS verdünnt. Die Zellen wurden 60 min mit 250 µl der primären Antikörper bzw. Phalloidin bei RT behandelt und danach mit PBS gewaschen. Im Falle einer Antikörper-Färbung wurde anschließend mit dem sekundären Antikörper ebenso verfahren. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen 10 min mit DAPI behandelt, bevor die Deckgläschen umgedreht (mit den Zellen nach unten) in einen Tropfen Einbettungsmittel (ProLong Antifade) auf einen Objektträger gelegt wurden.

*Erstellen der Bilder:* Die Bilder wurden mit der CCD-Kamera Axiocam erstellt, die am Fluoreszenzmikroskop Axioplan montiert war (beides von Zeiss). Es standen Neofluar-Objektive mit den Vergrößerungen 20X, 40X, 63X und 100X zur Verfügung.

#### **2.2.3.6 Zellzyklusanalysen**

Für die Zellzyklusanalysen wurde jeweils eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit L-929-Zellen pro Probe und Inkubationsdauer verwendet. Die Proben wurden in die Flaschen gegeben und die Zellen dann im Zellkulturinkubator bei 37 °C für 1 d oder 2 d inkubiert. Dabei durfte keine Konfluenz erreicht werden. Anschließend wurden die

Zellen trypsiniert, gezählt und  $1 \times 10^6$  Zellen im Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen (3 min bei 2000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen, Zellpellet resuspendieren in 1 ml PBS). Zur Fixierung wurden die Zellen nach dem letzten Waschschrift unter Schütteln (Vortex) in eiskaltem EtOH (70 %) resuspendiert. Die fixierten Zellen wurden bei 4 °C für einige Tage gelagert (bis zu maximal drei Wochen). Danach wurde erneut gewaschen, jetzt mit PBS-Saponin (0,1 % Saponin) und die Zellen in 500 µl PI-Lösung resuspendiert, die aus 2 mg/ml Propidium-Iodid und 50 mg/ml RNase in PBS-Saponin bestand. Die Proben wurden dann für mindestens 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend am Durchflussscytometer der DNA-Gehalt bestimmt. Die Messungen am FACSCalibur wurden in Zusammenarbeit mit Maria Höxter (Abteilung Genregulation und Differenzierung, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung) durchgeführt.

#### **2.2.3.7 Caspase- und Mycoplasmentest**

Für die Caspase-Tests wurden 3000 Zellen/Well (Z/W) eingesät und einige Stunden später die Proben in Triplikaten zugegeben. Die Kultur erfolgte über Nacht bei 37 °C. Der Test mit dem Caspase-Glo® 3/7 Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, lediglich adaptiert auf Mikrotiterplatten mit 384 Wells (statt 96 wie im Protokoll vorgesehen). Dafür wurde ein Viertel der angegebenen Volumina verwendet. Die Daten wurden mit Excel ausgewertet und der Induktionsfaktor bestimmt („RLU der Probe“ dividiert durch „RLU der unbehandelten Zellen“).

Die Mycoplasmentests wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, ebenfalls angepasst an MTP-384 mit einem Viertel der Volumina.

### **2.2.4 Automatische Mikroskopie – High-Content Analyse**

#### **2.2.4.1 Ausstattung**

ImageXpress Micro (IXM)

High-Speed Laser Autofokus

Digitale CCD-Kamera

300 Watt Xenon-Bogenlampe

Filter Sets:        -    DAPI  
                      -    FITC  
                      -    TRITC

- Texas Red

Nikon Objektive:

- 4X Plan Apo, NA (Numerische Apertur) 0,20
- 10X S Fluor, NA 0,50
- 20X S Fluor, NA 0,75
- 40X Plan Apo, NA 0,95
- 60X Plan Fluor, NA 0,85

Software:

- MetaXpress
- AcuityXpress

#### 2.2.4.2 Akquise-Einstellungen

MetaXpress ist die Software zur Steuerung des IXM. Die wichtigsten Einstellungen, die für die Aufnahme der Bilder vorgenommen werden mussten, sind im Folgenden beschrieben. Genauere Beschreibungen und detaillierte Angaben sind im Handbuch zu finden [Molecular Devices, Acquisition Guide, 2006].

**Vergrößerung:** Es standen fünf Objektive zur Verfügung. Um Zellen zu zählen, wurden das 4X- oder das 10X-Objektiv, für die HCA immer das 20X-Objektiv verwendet.

**Kamera-Binning** (Zusammenfassung): Beim Binning werden mehrere Pixel zu einem Pixel zusammengefasst. Bei einem Binning von 2 werden beispielweise 2x2 Pixel zu einem Pixel gruppiert. Je größer das Binning, desto niedriger die Auflösung, aber umso höher das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis. Binning reduziert außerdem die Belichtungszeiten sowie die Dauer der Akquise und die Größe der Datenmenge. Hier wurde immer ein Binning von 2 gewählt, da es einen guten Kompromiss zwischen anfallender Datenmenge und akzeptabler Auflösung darstellt.

**Kamera-Gain** (Verstärkung): Hier wird die Verstärkung der Kamera bestimmt. Je höher der Wert, desto kürzer werden die Belichtungszeiten. Dabei werden aber sowohl die Objekte als auch der Hintergrund verstärkt, deshalb wird das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis dadurch nicht verbessert. Es wurde immer ein Gain von 1 eingestellt.

**Platte:** Für die Einstellungen der Platte werden alle Plattendimensionen wie Höhe, Länge, Breite, Anzahl und Durchmesser der Wells usw. benötigt. Diese Angaben wurden vom Hersteller übernommen. Wichtig für die Einstellungen sind besonders die genaue Bestimmung der optischen Dichte des Plattenbodens sowie der Höhenunter-

schied zwischen zwei Wells. Diese können mithilfe des Lasers bestimmt werden, was für jede Platte einmal optimiert und dann übernommen wurde.

**Auswahl der Wells:** Für die Akquise können bestimmte Wells ausgewählt werden, in denen Fotos erstellt werden sollen. Dies wurde an die jeweilige Anwendung angepasst. Für die HCA wurden alle Wells gewählt, mit Ausnahme der Randwells, die aufgrund mechanischer Probleme nicht erreicht werden konnten.

**Auswahl der Sites** (Bildpositionen): Die Anzahl sowie die Lage der aufzunehmenden Bilder in jedem Well können manuell bestimmt werden. Dies wurde an die jeweilige Anwendung angepasst. Um z. B. alle Zellen in den Wells zu zählen, wurde die Anzahl der Sites so gewählt, dass das ganze Well abgedeckt war. Für die HCA wurden jeweils vier Sites pro Well ausgewählt, die nicht am Rand der Wells lagen.

**Kinetik:** Es gibt die Möglichkeit, mehrere Aufnahmen zeitverzögert hintereinander von der gleichen Position zu machen. Dies war aber für die Anwendungen der vorliegenden Arbeit nicht sinnvoll, deshalb wurde immer nur ein Zeitpunkt gewählt.

**Anzahl der Wellenlängen:** Für die HCA wurden immer drei Wellenlängen – also Filter – verwendet, und zwar DAPI, FITC und TRITC. Für alle anderen Anwendungen wurde die Anzahl je nach Versuchsansatz variiert.

**Autofokus-Option:** Es kann zwischen laserbasiertem und bildbasiertem Autofokus gewählt werden. Beim bildbasierten Fokus werden in einem vorher bestimmten Bereich mehrere Bilder erstellt und das am besten fokussierte Bild, basierend auf speziellen Algorithmen, automatisch ausgewählt. Diese Methode ist langsamer als der laserbasierte Autofokus, bei dem anhand von Laserreflektionen der Boden des Wells bestimmt wird und dann eine manuell festgelegte Entfernung (offset) von diesem Punkt als Fokusebene verwendet wird. Diese Option ist von Nachteil, wenn die aufzunehmenden Objekte nicht immer in der gleichen Ebene liegen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Anwendungen liegen die Objekte aber in einer Ebene, deshalb wurde immer der laserbasierte Fokus verwendet.

**Autofokus-Einstellungen** (laserbasiert): Hier kann gewählt werden, an welchen Stellen Laserreflektionen zur Bestimmung der Aufnahmeposition verwendet werden sollen (Plattenboden, Wellboden oder beides). Dafür spielt z. B. die Dicke des Plattenbodens eine Rolle. Hier wurde immer lediglich auf den Wellboden fokussiert. Des Weiteren kann bestimmt werden, ob für jedes Bild fokussiert werden soll oder nur

einmal pro Well. Die Einstellungen für diese Arbeit waren stets so, dass jedes Bild fokussiert wurde.

**Einstellungen für die Wellenlängen:** Für jede Wellenlänge müssen die Belichtungszeit und die Position für die Aufnahme (Z-Position, Entfernung vom Wellboden) bestimmt werden. Es können automatisch Belichtungszeiten von der Software ausgegeben werden. Diese wurden dann aber manuell für jede Färbung optimiert. Der Abstand des Objekts vom Boden wurde ebenfalls manuell bestimmt. Er lag immer im Bereich von einigen  $\mu\text{m}$ .

#### 2.2.4.3 Bildanalyse: Software, Einstellungen und Hintergrund

Im Folgenden werden nur die für diese Arbeit wichtigen Einstellungen und Parameter erwähnt [Molecular Devices, Analysis Guide, 2006; Molecular Devices, AcuityXpress User Guide, 2007].

**Applikationsmodule:** Für die Analyse werden die Bilder segmentiert, also räumlich aufgeteilt, so dass verschiedene Objekte erkannt und markiert werden. Dieser Schritt wird ebenfalls mit MetaXpress durchgeführt. Dafür stehen verschiedene Applikationsmodule zur Verfügung, die jeweils nur für bestimmte Versuchsansätze geeignet sind. Für diese Arbeit wurden nur die Module „Multi wavelength cell scoring“ (MWCS) und „Transfluor“ verwendet. Das MWCS-Modul wurde für die meisten Ansätze/Färbungen eingesetzt, lediglich für anti-SC-35 wurde das Transfluor-Modul genutzt.

**Zell- und bildbasierte Auswertung:** Grundsätzlich lässt sich die Auswertung der High-Content Analysen in zellbasiert und bildbasiert unterscheiden. Bei der zellbasierten Analyse werden die einzelnen Werte für jede Zelle angegeben. Bildbasierte Daten sind entweder der Durchschnitt aller Zellen im Bild oder die Summe. In einigen Modulen unterscheiden sich die Deskriptoren, die für diese beiden Analysen ausgegeben werden.

**MWCS:** Die für die Anwendung des MWCS-Moduls nötigen Einstellungen sind für jede Wellenlänge gleich: ungefähre Größe der zu markierenden Objekte (minimale und maximale Breite) sowie die Intensität der Färbung. Die Einstellungen wurden für jede Färbung manuell optimiert. Die gewonnenen Deskriptoren, die für die weitere Analyse herangezogen werden können, sind in Tabelle 2-4 aufgelistet, dabei entspricht W1 dem DAPI-, W2 dem FITC- und W3 dem TRITC-Filter.



**Tabelle 2-4: Deskriptoren des MWCS-Moduls****Bildbasierte Analyse**

*Total cells*: Gesamtzellzahl (auf Zellkernfärbung W1 basierend)

(%) *Positive W2/W3*: Anzahl gefärbter Zellen für jede Wellenlänge (absolut und relativ)

*Scoring profile 1--/12-/1-3/123*: absolute Anzahl der Zellen, die z. B. nur in den Wellenlängen 1 und 2 gefärbt sind, aber nicht in 3 (12-)

**Zellbasierte Analyse (Werte pro Zelle)**

*Total area*: Zellkernfläche

*Stained area W1/W2/W3*: gefärbte Fläche der jeweiligen Färbung

*Positive W2/W3*: absolute Anzahl gefärbter Zellen für jede Wellenlänge

*Average/integrated intensity W1/W2/W3*: durchschnittliche/integrierte Intensität der Färbungen

**Transfluor:** Beim Transfluor-Modul werden die gleichen Einstellungen für die Objekte vorgenommen wie beim MWCS-Modul. Die Objekte, die hier bestimmt werden, sind der Zellkern und kleine Vesikel, wie sie z. B. bei der Färbung des Splicing-Faktors SC-35 auftreten. Dieses Modul wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich für die Färbungen von SC-35 verwendet. Die Deskriptoren der zellbasierten Analyse entsprechen hier denen der bildbasierten Analyse.

**Tabelle 2-5: Deskriptoren des Transfluor-Moduls****Bildbasierte Analyse**

*Vesicle count (per cell)*: Anzahl der Vesikel (pro Zelle)

*Vesicel area (total/per cell)*: Fläche der Vesikel (gesamt oder pro Zelle)

*Vesicel intensity (average/integrated)*: durchschnittliche/integrierte Intensität der Vesikelfärbung

*Nuclear count*: Anzahl der Zellkerne

*Nuclear area (total/per cell)*: Fläche der Zellkerne (gesamt oder pro Zelle)

*Nuclear intensity (average/integrated)*: durchschnittliche/integrierte Intensität der Zellkerne

*(Cellular) Texture/gradient/laplacian index*: verschiedene Texturparameter

**2.2.4.4 Datenanalyse: Software, Einstellungen und Hintergrund**

Die aus den Applikationsmodulen gewonnenen Daten können mit der Software AcuityXpress analysiert werden.

**Annotation:** Jede Platte musste annotiert werden. Dafür können Listen mit den Verbindungen und den entsprechenden Plattenpositionen mit Excel erstellt und dann in AcuityXpress importiert werden. Weitere Beschreibungen der Verbindungen, wie das Target, die Konzentration oder das Molekulargewicht können später als „Row descriptors“ eingefügt und geändert werden.

**Normalisierung:** Da z. B. durch unterschiedlich effektive Färbungen Variationen zwischen den Messungen der Mikrotiterplatten auftreten können, sollten die Daten normalisiert werden, um die verschiedenen Platten trotzdem miteinander vergleichen zu können. Es gibt bei AcuityXpress grundsätzlich zwei verschiedene Arten der Normalisierung. Die eine Normalisierungsmethode bezieht positive und negative Kontrollen mit ein. In der hier durchgeführten HCA waren aber nicht für alle Färbungen Kontrollen vorhanden, daher wurde die andere Normalisierungsmethode gewählt, die alle Daten im absoluten Verhältnis der gesamten Platte normalisiert. Für jede Färbung wurden hierbei der Minimal- und der Maximalwert bestimmt, also der dynamische Wertebereich. Jede Färbung musste in der hier durchgeführten HCA einzeln normalisiert werden, da jede Färbung wie ein eigener Test betrachtet werden musste. Der Zielbereich wurde immer auf 0-100 gesetzt und mithilfe eines Skalierungsfaktors und eines „Offset“-Wertes wurde ein neuer, normalisierter Deskriptor errechnet. Dabei war zu beachten, dass lediglich solche Deskriptoren normalisiert wurden, die relativ zur Gesamtzellzahl und abhängig von der Fluoreszenzintensität waren. Die Normalverteilung der Daten blieb nach der Normalisierung erhalten.

**Erstellung der Datensätze:** Aus den gewonnenen Daten müssen für die weitere Analyse Datensätze erstellt werden, bestehend aus allen Mikrotiterplatten eines Ansatzes. Für die zell- und bildbasierte Analyse sind dabei separate Datensätze notwendig. Für bildbasierte Datensätze wird der Durchschnitt für jedes Bild von MetaXpress mit AcuityXpress weiter verrechnet, indem der Mittelwert aller Bilder mit der gleichen Behandlung (gleiche Probe) bestimmt wird. Bei der zellbasierten Analyse werden die Mittelwerte aller Zellen mit der gleichen Behandlung errechnet. Die so bestimmten Werte können daher zwischen zell- und bildbasierter Analyse leicht variieren, obwohl z. T. gleiche Parameter bestimmt werden. Bei der Erstellung der Datensätze wurden die Deskriptoren ausgewählt, die bei der weiteren Analyse des Datensatzes berücksichtigt werden sollten. Zu einem solchen Datensatz gehörten dann alle Platten eines Ansatzes, bei der hier etablierten HCA also sechs.

**Zentrieren und Skalieren:** Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten können diese zentriert und skaliert werden, was einem weiteren Schritt zur Normalisierung der

Daten entspricht. Da man davon ausgeht, dass die Daten einer Normalverteilung entsprechend verteilt sind, kann der z-Wert errechnet werden. Hierbei wird von jedem Messwert der arithmetische Mittelwert subtrahiert und durch die Standardabweichung dividiert. Nach dieser Transformation hat jeder Parameter einen Mittelwert von 0 und eine Standardabweichung von 1, wobei die Verteilung vor und nach der Berechnung gleich bleibt.

**Heat Maps:** Nach diesen Vorprozessen ergibt sich für jede getestete Verbindung ein Profil. Die Profile können z. B. in Heat Maps dargestellt werden. Dabei sind Werte  $> 0$  rot und  $< 0$  grün markiert. Je intensiver die Farbe, umso größer ist der Abstand zu 0.

**Cluster-Analysemethoden:** Ziel der Clusteranalyse ist es, eine große Anzahl von Objekten (in der HCA chemische Verbindungen) so zu unterteilen, dass ähnliche Objekte in dasselbe Cluster fallen, während unähnliche Objekte auch in unterschiedliche Cluster gruppiert werden. Es gibt zahlreiche verschiedene Cluster-Algorithmen, von denen jeder Vor- und Nachteile mit sich bringt. Die Clustermethoden lassen sich grundsätzlich in hierarchisch und nicht-hierarchisch (oder auch partitionierend) unterscheiden (s. u.).

**Maße für die Ähnlichkeit von Verbindungen („similarity metric“):** Für die Clusteranalyse muss festgelegt werden, wie die Nähe (Ähnlichkeit) bzw. die Distanz (Verschiedenheit) zwischen zwei Objekten, einem Objekt und einem Cluster oder zwischen zwei Clustern gemessen werden soll. Die Ähnlichkeitsmaße, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind das Abstandsmaß „Quadrat des Euklidischen Abstands“ und Pearsons Korrelationskoeffizient, auch einfacher linearer Korrelationskoeffizient genannt. Beide können Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Je näher der Wert an 1 ist, desto größer ist der Zusammenhang der betrachteten Objekte/ Cluster.

**Hierarchische Clusteranalyse:** Hierarchische Clusteranalysen zeigen den Zusammenhang aller Verbindungen untereinander. Die Resultate werden typischerweise in einem Dendrogramm dargestellt. Je größer die Ähnlichkeiten der Probenprofile sind, desto näher werden sie zusammen gruppiert. Alle Proben werden so miteinander verbunden. Sind die Unterschiede ihrer Profile größer, liegen die Proben bzw. Gruppen weiter auseinander. Zusätzlich zu dem erwähnten Ähnlichkeitsmaß muss hier noch ein Verschiedenheitsmaß („linkage method“) definiert werden, das den Abstand zwischen zwei Clustern misst. Es kann zwischen drei Varianten entschieden werden: „single linkage“, „complete linkage“ und „average linkage“. Für diese Arbeit wurde stets „average linkage“ gewählt, hier wird der durchschnittliche Abstand zwischen den

Gruppen verwendet. Für die Daten, die aus der High-Content Analyse gewonnen wurden, wurde primär die hierarchische Clusteranalyse angewendet.

**Nicht-hierarchische Clusteranalyse:** Zu den nicht-hierarchischen Clustermethoden gehören z. B. „K-Means clustering“ und „Self-organizing maps“ (SOM), die man auch als Partitionierungs-Methoden beschreiben kann. Im Gegensatz zum hierarchischen Clustering wird hierbei ein Satz von Objekten anhand der Ähnlichkeiten/Verschiedenheiten in eine bestimmte Zahl Cluster eingeteilt, ohne hierarchische Struktur. Dazu wird die Anzahl der Gruppen manuell festgelegt. K-Means clustering und SOM unterscheiden sich nur insofern, als bei den SOM die Gruppen zusätzlich in einem 2-dimensionalen Gitter dargestellt werden, wobei sich ähnliche Gruppen auch in räumlicher Nähe befinden. Gruppen, deren Verbindungen sehr unterschiedliche Profile aufweisen, nehmen dabei hingegen weiter auseinander liegende Positionen ein. Für die hier etablierte HCA wurden zusätzlich zu den hierarchischen Clusteranalysen auch SOM verwendet, die alle auf dem Quadrat des Euklidischen Abstands basieren.

**Einzelvergleich („Match to mean“):** Für jedes einzelne Objekt bzw. für jede Substanz kann zusätzlich eine Rangfolge der Ähnlichkeiten zu allen anderen Substanzen des Datensatzes ausgegeben werden. Diese Rangfolge kann auch wieder sowohl auf dem Quadrat des Euklidischen Abstands als auch auf Pearsons Korrelationskoeffizienten beruhen.

#### 2.2.4.5 Etablierung der HCA

Die Vorbereitung der Mikrotiterplatten für das automatische Mikroskop beinhaltet vor der Optimierung der einzelnen Teile folgende Arbeitsschritte:

- (1) Trypsinierung subkonfluenten Zellen und Bestimmung der Zellzahl (s. Kapitel 2.2.3.1)
- (2) Einsäen der Zellen in die MTP-384 mit 2000 Z/W (60 µl/W)
- (3) Inkubation (37 °C, 10 % CO<sub>2</sub>) für einige Stunden (~ 4 h) oder über Nacht
- (4) Zugabe der Proben
- (5) Inkubation (37 °C, 10 % CO<sub>2</sub>) für einige Stunden oder über Nacht
- (6) Fixierung, wie in Abschnitt 2.2.3.5 beschrieben, nur 50 µl/W
- (7) Färbung, wie in Abschnitt 2.2.3.5 beschrieben, Verdünnungen der Farbstoffe nach Herstellerangaben

Die Schritte (2), (6) und (7) erfolgten manuell mithilfe einer Matrix Mehrkanal-Pipette im Multidispense-Modus.

Die äußeren Wells konnten vom IXM aufgrund mechanischer Schwierigkeiten nicht erreicht werden. Das 20X-Objektiv stieß in diesem Bereich an den Plastikrand der Mikrotiterplatten. Daher wurden in allen Versuchen die Reihen A und P, sowie die Spalten 1 und 24 nicht verwendet.

Für die Etablierung der verschiedenen Schritte der HCA wurden jeweils leichte Veränderungen der oben genannten Schritte durchgeführt. Diese sind im Folgenden beschrieben.

*Entfernen der Flüssigkeiten aus den Wells:* Es wurden PtK2-Zellen verwendet und ohne Proben über Nacht inkubiert. In vier Mikrotiterplatten wurden je 16 Wells mit MeOH/Aceton und mit Formalin fixiert. Dabei wurde für jede Platte eine andere Methode zum Entfernen der Flüssigkeiten aus den Wells verwendet: 1) Absaugen mit einer Vakuum-Absaugpumpe, 2) Langsames Absaugen mit einer Mehrkanalpipette, 3) Abzentrifugieren (MTP mit dem Boden nach oben in die Zentrifuge, 5 sec bei 300 rpm), 4) Ausschlagen (erst grob über einer Wanne, dann die Reste auf saugfähigem Papier vorsichtig ausklopfen). Nach der Fixierung wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und so viele Bilder in jedem Well erstellt, dass das komplette Well abgedeckt war.

*Zelllinie:* Es wurden vier Zelllinien getestet, A-498, A-549, KB-3-1 und PtK2. In einem Ansatz wurden die Actinfilamente und die Mikrotubuli gefärbt, in einem anderen Test die phosphorylierte MAP-Kinase p38. Für letzteren Ansatz wurden jeweils acht Parallelwells jeder Zelllinie nach der Inkubation über Nacht für 2 h mit MeOH bzw. 5  $\mu$ M Anisomycin behandelt. Beide Ansätze wurden mit Formalin fixiert und danach gefärbt (DAPI, Alexa Fluor 488 Phalloidin, anti- $\alpha$ -Tubulin, Atto 594 anti-mouse bzw. DAPI, anti-Phospho-p38, Atto 488 anti-rabbit).

*Adhärenz der KB-3-1-Zellen:* Für die Varianten der Formalin-Konzentration wurden KB-3-1-Zellen, wie oben beschrieben, eingesät und mit 3, 4, 5 oder 6 %iger Formalin-Lösung fixiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit DAPI gefärbt und je 9 Bilder pro Well mit dem 10X-Objektiv aufgenommen. Für den Vergleich der Dauer der Fixierung wurden die KB-3-1-Zellen nach Standardprotokoll in vier MTP eingesät und ohne Proben inkubiert. Es wurde für 5, 10, 15 bzw. 20 min mit Formalin fixiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und mit dem 4X-Objektiv jeweils

vier Bilder pro Well erstellt. Dadurch war die Abdeckung des ganzen Wells gewährleistet.

*Zelldichte:* Die A-498 und die KB-3-1 wurden mit 1000 Z/W, 2000 Z/W, 3000 Z/W, 4000 Z/W und 5000 Z/W ausplattiert, ohne Proben inkubiert und die Zellkerne, die Actinfilamente und die Mikrotubuli gefärbt. Die Bilder wurden mit dem 10X-Objektiv aufgenommen.

*Randeffekt:* Für diesen Teilversuch wurden in drei MTP-384 in jede zweite Spalte (außer Spalte 23 statt 22) Zellen eingesät. Anschließend wurde Arbeitsschritt (3) bei zwei der drei Ansätze variiert, indem die Platten 1 h bei Raumtemperatur unter der sterilen Arbeitsbank gelagert wurden, bevor sie über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Dabei wurde bei einer MTP der Deckel entfernt. Es wurden keine Proben zugegeben. Lediglich die Zellkerne wurden mit DAPI markiert und zwölf Bilder in jedem Well aufgenommen. Zur Auswertung wurde die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) der Zellzahl für jedes Well berechnet.

#### 2.2.4.6 Referenzverbindungen

Um die optimalen Konzentrationen der Referenzverbindungen zu evaluieren, wurden Zellen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, eingesät. Die Proben wurden dann mit dem Pintool zugegeben und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden nur die Zellkerne gefärbt und die Zellzahl für jedes Well ermittelt. Für die HCA wurden die Referenzverbindungen dann in den so ermittelten Konzentrationen in DMSO-Lösung in eine MTP-96 gegeben. Sie wurden dann mithilfe des BioMek-Pipettierroboters mit einem Pintool in die Zellkulturplatten übertragen. Dabei wurden ca. 60-70 nl transferiert. Jede Probe wurde 2x übertragen, so dass die Hälfte der MTP-384 für die Messung am IXM von den Referenzsubstanzen belegt war.

**Tabelle 2-6: Referenzverbindungen der HCA**

Name	Wirkmechanismus in euk. Z.	Literatur
A23187	Ionen-Carrier (v. a. Calcium)	Römpp, 2009
Actinomycin D	inhibiert die Transkription	Römpp, 2009
Alsterpaullone	inhibiert eine CDK	Lahusen et al., 2003
Amanitin	blockiert die mRNA-Synthese	Römpp, 2009
Anisomycin	inhibiert Protein-Biosynthese	Römpp, 2009
Aphidicolin	inhibiert DNA-Polymerase	Römpp, 2009
Apicidin	Histon-Deacetylase-Inhibitor	Han et al., 2000
Apicularen	V-ATPase-Inhibitor	Huss et al., 2005
Archazolid B	V-ATPase-Inhibitor	Huss et al., 2005
Argyrin A	Proteasom-Inhibitor	Nickeleit et al., 2008
Brefeldin A	zerstört Golgi-Apparat	Römpp, 2009
Camptothecin	Topoisomerase I-Inhibitor	Römpp, 2009

---

Chelerythrin	Protein Kinase C-Inhibitor	Herbert et al., 1990
Chivosazol A	hemmt Polymerisation	Diestel et al., 2009
Chondramid C	stabilisiert Actinfilamente	Sasse et al., 1998
Colchicin	zerstört Mikrotubuli	Römpf, 2009
Cruentaren A	F-ATPase-Inhibitor	Kunze et al., 2006
Cycloheximid	hemmt Protein-Biosynthese	Römpf, 2009
Cyclosporin A	beeinflusst Calcium-Regulation	Kimball & Sell, 1989
Cytochalasin D	fördert Actin-Depolymerisation	Römpf, 2009
Dexamethason	immunsuppressive Wirkung	Römpf, 2009
Doxorubicin	Topoisomerase II-Inhibitor	Römpf, 2009
Emetin	inhibiert Protein-Biosynthese	Römpf, 2009
Epothilon B	stabilisiert die Mikrotubuli	Höfle, 2009
Etoposid	Topoisomerase-Inhibitor	van Maanen et al., 1988
Gephyronsäure A	inhibiert Protein-Synthese	Sasse et al., 1995
Griseofulvin	hemmt Spindelapparat-Aufbau	Römpf, 2009
H89	Protein Kinase A-Inhibitor	Lochner & Moolman, 2006
Indirubin-3'-monoxim	inhibiert eine CDK	Buolamwini, 2000
LY294002	PI3-Kinase-Inhibitor	Vlahos et al., 1994
Methotrexat	hemmt DNA-Synthese	Römpf, 2009
Mevastatin	inhibiert Cholesterol-Biosynthese	Römpf, 2009
MG132	Proteasom-Inhibitor	Rock et al., 1994
Myriaporon	inhibiert Protein-Synthese	Hines et al., 2006
Myxothiazol A	hemmt die Atmungskette	Römpf, 2009
Neopeltolid	hemmt die Atmungskette	Ulanovskaya et al., 2008
Nocodazol	fördert Depolym. der Mikrotubuli	Jordan et al., 1992
Okadainsäure	hemmt Proteinphosphatasen	Römpf, 2009
Oligomycin	F-ATPase-Inhibitor	Römpf, 2009
Oxamflatin	Histon-Deacetylase-Inhibitor	Kim et al., 1999
PD169316	p38-MAP-Kinase-Inhibitor	Gallagher et al., 1997
PMA	aktiviert Protein-Kinase C	Römpf, 2009
Podophyllotoxin	fördert Polym. der Mikrotubuli	Schilstra et al., 1989
Puromycin	hemmt Protein-Biosynthese	Römpf, 2009
Purvalanol A	inhibiert eine CDK	Gray et al., 1998
Rapamycin	PI3-Kinase-Inhibitor	Römpf, 2009
Ratjadon C	blockiert den nuklearen Export	Köster et al., 2003
Rhizopodin A	inhibiert Actin-Polymerisation	Gronewold et al., 1998
Saframycin Mx1	inhibiert DNA-Synthese	Pospiech et al., 1996
SB202190	p38-MAP-Kinase-Inhibitor	Lee et al., 1994
SB203580	p38-MAP-Kinase-Inhibitor	Lee et al., 1994
Scriptaid	Histon-Deacetylase-Inhibitor	Su et al., 2000
Simvastatin	inhibiert Cholesterol-Biosynthese	Römpf, 2009
Soraphen A	inhibiert die Lipid-Synthese	Römpf, 2009
Staurosporin	inhibiert Protein-Kinasen	Römpf, 2009
Taxol	stabilisiert die Mikrotubuli	Römpf, 2009
Trichostatin	Histon-Deacetylase-Inhibitor	Monneret, 2004
Tubulysin B	inhibiert Polym. der Mikrotubuli	Khalil et al., 2006
Tunicamycin	Ansammlung fehlgefalteter Proteine	Huet et al., 2003
Velcade	Proteasom-Inhibitor	Römpf, 2009
Vinblastin	hemmt Polym. der Mikrotubuli	Römpf, 2009
Wortmannin	PI3-Kinase-Inhibitor	Römpf, 2009

---

#### **2.2.4.7 Tests der Antikörper/Farbstoffe**

Es handelte sich nicht bei allen Farbstoffen um Antikörper. Phalloidin ist ein Giftstoff aus dem Knollenblätterpilz, der an F-Actin bindet. Daher kann es fluoreszenzmarkiert zur Färbung von Actinfilamenten dienen. Bei DAPI handelt es sich ebenfalls nicht um einen Antikörper, sondern um einen Fluorophor, der speziell an doppelsträngige DNA bindet [Römpf, 2009].

Alle Antikörper/Farbstoffe wurden im Hinblick auf folgende Kriterien untersucht:

- Fixierung der Zellen vor der Färbung
- Verdünnung des Farbstoffs/primären Antikörpers
- Inkubationsdauer
- Verdünnung des sekundären Antikörpers

Dazu wurden für jeden Farbstoff Zellen wie beschrieben in eine Mikrotiterplatte eingesät und über Nacht mit MeOH bzw. verschiedenen Proben inkubiert. In einigen Fällen wurden die Zellen zunächst über Nacht bei 37 °C inkubiert und erst am nächsten Tag für einige Stunden mit den entsprechenden Proben inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte der Wells mit Formalin, die andere Hälfte mit MeOH/Aceton fixiert und mit drei verschiedenen Verdünnungen des primären Antikörpers/Farbstoffs für 1 h oder über Nacht behandelt. Dann erfolgte die Färbung mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in zwei verschiedenen Verdünnungen. Die Tests wurden so durchgeführt, dass jeweils zwei Wells gleich behandelt wurden (gleiche Probe, gleiche Fixierung, gleiche Verdünnungen der Antikörper/Farbstoffe). Alle Tests wurden mit den KB-3-1-Zellen durchgeführt und die Ergebnisse für die A-498-Zellen übernommen.

Wenn vorhanden, wurden für die primären Antikörper/Farbstoffe größtenteils die vom Hersteller vorgeschlagenen Verdünnungen sowie eine niedrigere und eine höhere Verdünnung getestet. Die sekundären Antikörper wurden in zwei Verdünnungen eingesetzt, und zwar 1:500 und 1:1000. Alle Verdünnungen erfolgten in PBS mit 10 % FBS.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Biologische Wirkspektren der Naturstoffe und Naturstoffderivate

Alle drei in dieser Arbeit untersuchten Naturstoffgruppen wurden auf ihr biologisches Wirkspektrum hin getestet. Standardmäßig wurden dafür zwölf Mikroorganismen (Bakterien und Pilze) und vier bis fünf transformierte Zelllinien überprüft. Bei einigen Verbindungen wurden zusätzlich Proliferationstests mit einer primären Zelllinie, Bestimmungen der Affinität zur Effluxpumpe P-Glycoprotein, Fluoreszenzfärbungen, Tests zur Actin-(De)Polymerisation oder Zellzyklusuntersuchungen durchgeführt.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Tabelle 3-1 die Hemmhöfe der Mikroorganismen mit den bekannten Verbindungen Ciprofloxacin (Antibiotikum) und Nystatin (Antimykotikum) angegeben. Tabelle 3-2 zeigt die Ergebnisse einiger Proliferationstests mit den bekannten Naturstoffen Epothilon und Vinblastin.

**Tabelle 3-1: Agardiffusionstests von Vergleichssubstanzen**

Angaben der Hemmhöfe (mm); Cipro.: Ciprofloxacin; TolC: *Escherichia coli* tolC; Kbp: *Klebsiella pneumoniae*; Psa: *Pseudomonas aeruginosa*; Sta: *Staphylococcus aureus*; Mcl: *Micrococcus luteus*; Myp: *Mycobacterium phlei*; Caa: *Candida albicans*; Hna: *Hansenula anomala*; Scc: *Saccharomyces cerevisiae*; Asn: *Aspergillus niger*; Boc: *Botrytis cinerea*; Pyd: *Pythium debaryanum*

		TolC	Kbp	Psa	Sta	Mcl	Myp	Caa	Hna	Scc	Asn	Boc	Pyd
Cipro.	2 mg/ml	32	46	32	47	40	52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nystatin	1 mg/ml	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18	23	20	29	22	17

**Tabelle 3-2: Proliferationstests von Vergleichssubstanzen**

Angaben der  $IC_{50}$ -Werte (nM); Bestimmung der P-Glycoprotein-Affinität

	L-929	KB-3-1	U-937	PtK2	KB-V1 ohne/ mit Vp.	P-GP- Affinität
Epothilon	1,4	1,2	0,39	0,79	0,59/0,24	2,5
Vinblastin	18	8,6	0,37	46	115/1,0	115

##### 3.1.1 Tetramsäuren

Tetramsäuren bilden eine heterogene Gruppe von Naturstoffen, die einen stickstoffhaltigen 5-gliedrigen Heterocyclus mit 2-Ketogruppen in meta-Stellung gemeinsam haben.

### 3.1.1.1 Melophline

Die größte Gruppe der in dieser Arbeit getesteten Tetramsäuren bilden die Melophline, die oft auch als Metall-Komplexe vorlagen. Sie besitzen alle eine 3-Acyltetramsäure und unterscheiden sich lediglich im Rest am Kohlenstoffatom C5 (Wasserstoff oder Methylgruppe) und in der Acylseitenkette (Ort und Anzahl von Methylverzweigungen, Kettenlänge). Die Verbindungen wurden so synthetisiert und getestet, wie sie auch aus der natürlichen Quelle isoliert wurden: die Melophline A und G achiral, Melophlin B als Mischung zweier (5S)-Diastereomere, die Melophline C und R als Mischungen von vier Diastereomeren und Melophlin P als Racemat der (5S)- und (5R)-Enantiomere, wobei von Letzterem zusätzlich eine Lösung mit ausschließlich dem (5S)-Enantiomer zur Verfügung stand.

Die Ergebnisse der biologischen Charakterisierung, sowohl der freien als auch der komplexierten Melophline, sind in Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4 dargestellt.

**Tabelle 3-3: Agardiffusionstests der Melophline**

Angaben der Hemmhöfe (mm); Angabe mehrerer Werte bei abweichenden Ergebnissen in verschiedenen Versuchsansätzen

	TolC	Kbp	Psa	Sta	Mcl	Myp	Caa	Hna	Scs	Asf/n	Boc	Pyd
MelA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca(MelA) <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La(MelA) <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg(MelA) <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zn(MelA) <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mel B	<b>8</b>	0	0	<b>9</b>	<b>8/0</b>	<b>10</b>	0	0	0	0	0	0
Mel C	<b>8</b>	0	0	<b>8</b>	<b>7/0</b>	<b>10</b>	0	0	0	0	0	0
Ga(MelC) <sub>3</sub>	<b>8</b>	0	0	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	0	0	0	0	0	0
La(MelC) <sub>3</sub>	<b>8</b>	0	0	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	0	0	0	0	0	0
Ru(MelC)	<b>7</b>	0	0	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	0	0	0	0	0	0
MelG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca(MelG) <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MelM	<b>7</b>	0	0	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	0	0	0	0	0	0
La(MelM) <sub>3</sub>	<b>7</b>	0	0	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	0	0	0	0	0	0
MelP	0	0	0	<b>8</b>	<b>8/0</b>	0	0	0	0	0	0	0
(5S)-MelP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
La(MelP) <sub>3</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MelQ	0	0	0	<b>13</b>	<b>8</b>	0	0	0	0	0	0	0
MelR	0	0	0	<b>13</b>	<b>9/0</b>	0	0	0	0	0	0	0
Mel„A/B“	<b>9</b>	0	0	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	0	0	0	0	0	0
Mel„A/C“	<b>9</b>	0	0	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	0	0	0	0	0	0

Wie der Tabelle 3-3 zu entnehmen ist, zeigte keines der getesteten Melophline eine Wirkung auf die Hefen oder Hyphenpilze des Standardtestsatzes. Die Melophline A und G sowie ihre komplexierten Formen hemmten auch bei keiner der Bakterienpezies das Wachstum, wohingegen die Melophline B, C, M, „A/B“ und „A/C“ Hemmhöfe sowohl bei *E. coli TolC* als auch bei den drei grampositiven Bakterien zeigten. Das Wachstum von *S. aureus* und *M. luteus* wurde von den unkomplexierten Melophlinen P, Q und R gehemmt. Alle Hemmhöfe waren im Vergleich zu denen des getesteten Antibiotikums klein (vgl. Tabelle 3-1). Die Agardiffusionstests wurden nur

visuell ausgewertet, deshalb waren Hemmhöfe mit einem Durchmesser von 7 oder 8 mm z. T. schwer zu erkennen (die Antibiotikatestblättchen hatten selbst schon einen Durchmesser von 6 mm). Dadurch können die in einigen Fällen aufgetretenen Schwankungen erklärt werden.

**Tabelle 3-4: Proliferationstests der Melophline**

Angaben der  $IC_{50}$ -Werte ( $\mu M$ ); Bestimmung der P-Glycoprotein-Affinität

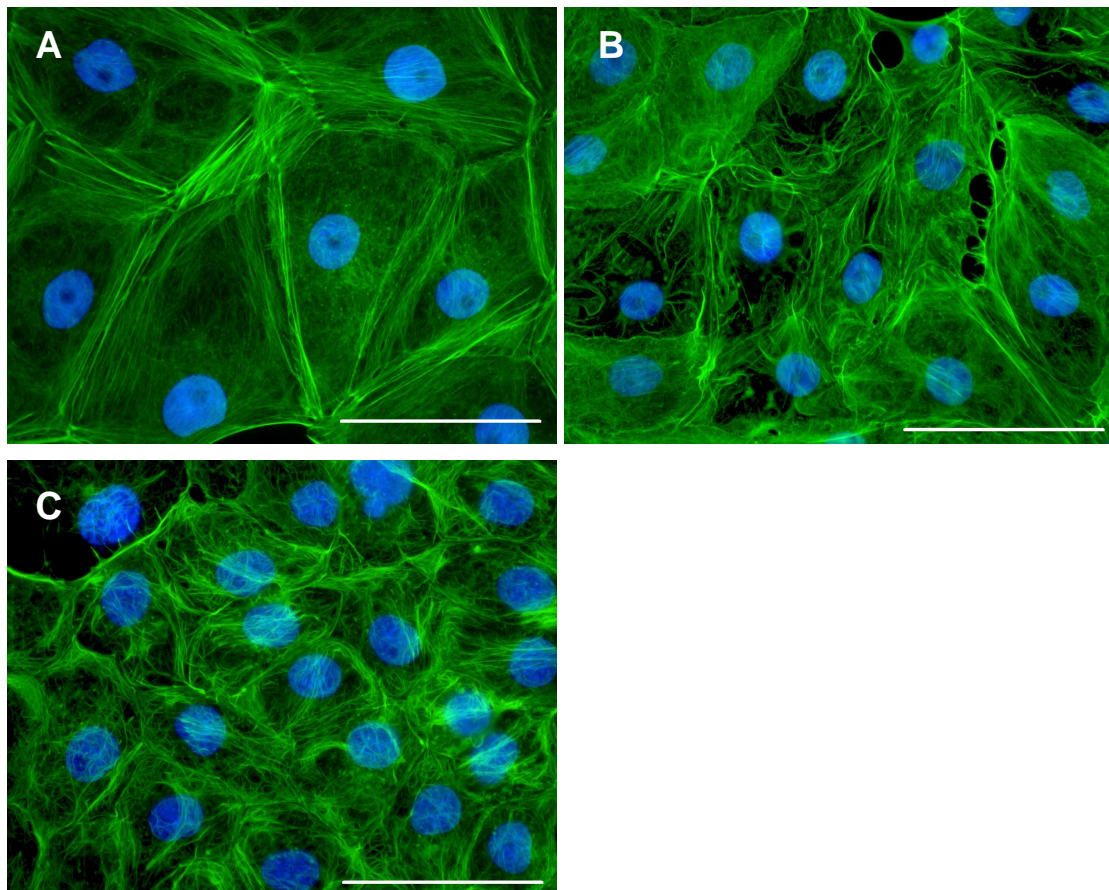
	L-929	KB-3-1	A-498	U-937	PtK2	HUV./ H MV.	KB-V1 ohne/ mit Vp.	P-GP- Affin.
MelA	22	19	8,5	8,0	19	4,0/6,5	20/8,8	2,3
Ca(MelA) <sub>2</sub>	8,4	10	27	5,8	6,5	n.d./7,4	9,4/6,7	1,4
La(MelA) <sub>3</sub>	18	17	6,0	2,3	6,3	n.d./n.d.	6,1/5,9	1,0
Mg(MelA) <sub>2</sub>	12	12	8,5	5,4	8,3	n.d./7,6	9,7/5,9	1,6
Zn(MelA) <sub>2</sub>	12	10	9,1	3,9	9,8	n.d./3,0	9,1/5,2	1,8
Mel B	7,7	9,3	10	3,4	6,8	n.d.	6,8/4,9	1,4
Mel C	13	11	31	3,7	5,9	12/n.d.	20/11	1,8
Ga(MelC) <sub>3</sub>	7,7	7,7	8,7	4,0	2,7	n.d./n.d.	6,0/3,3	1,8
La(MelC) <sub>3</sub>	2,5	1,9	4,5	0,5	0,5	n.d./n.d.	1,2/1,8	0,7
Ru(MelC)	3,9	2,2	6,7	1,3	1,0	n.d./4,2	1,9/5,1	0,4
MelG	22	23	n.d.	6,8	12	n.d./7,1	6,8/9,3	0,7
Ca(MelG) <sub>2</sub>	9,5	10	7,7	1,6	2,9	n.d./n.d.	4,7/7,3	0,6
MelM	17	13	9,7	1,3	4,6	3,6/n.d.	7,8/4,8	1,6
La(MelM) <sub>3</sub>	4,7	2,5	4,1	0,6	1,1	n.d./n.d.	1,8/1,3	1,4
MelP	11	16	11	3,8	16	n.d./6,0	9,0/8,2	1,1
(5S)-MelP	16	12	15	8,2	8,2	n.d./n.d.	8,2/8,5	1,0
La(MelP) <sub>3</sub>	5,9	4,9	4,7	1,1	2,8	0,9/n.d.	3,9/4,7	0,8
MelQ	17	17	14	3,7	3,1	3,1/n.d.	11/5,7	1,9
MelR	6,0	6,0	n.d.	2,2	2,1	n.d./n.d.	4,0/3,7	1,1
Mel <sub>„A/B“</sub>	55	29	16	23	n.d.	4,2/n.d.	9,7/13	0,7
Mel <sub>„A/C“</sub>	26	9,7	2,9	1,3	n.d.	2,9/n.d.	2,9/2,9	1,0

Tabelle 3-4 zeigt unter anderem die Ergebnisse der Proliferationshemmtests mit transformierten Säugerzellen. Allgemein ließ sich feststellen, dass alle  $IC_{50}$ -Werte im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich lagen. Es bestanden also nur relativ kleine Unterschiede zwischen den Melophlinen, besonders im Vergleich zu Etoposin und Vinblastin, deren  $IC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich lagen. Beim Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte der freien Melophline zeigte Melophlin R die niedrigsten Werte, hatte also

die stärkste antiproliferative Wirkung. Die Melophline A, G und „A/B“ waren am wenigsten wirksam. Die komplexierten Verbindungen wiesen meistens niedrigere Werte auf als ihre freien Entsprechungen.

Die  $IC_{50}$ -Werte der primären Zelllinien lagen alle im Bereich der Werte der transformierten Zelllinien oder erstgenannte waren sogar sensibler. Mit Werten von 0,4 bis 2,3 wurde keine deutliche Affinität zum ABC-Transporter P-Glycoprotein festgestellt (Vergleich Vinblastin: 115).

Es wurden zusätzlich Fluoreszenzfärbungen des Endoplasmatischen Reticulums sowie der Mikrotubuli und der Actinfilamente von PtK2-Zellen nach der Behandlung mit den freien Melophlinen ( $20 \mu\text{g/ml} \approx 57$  bis  $65 \mu\text{M}$ ) durchgeführt.



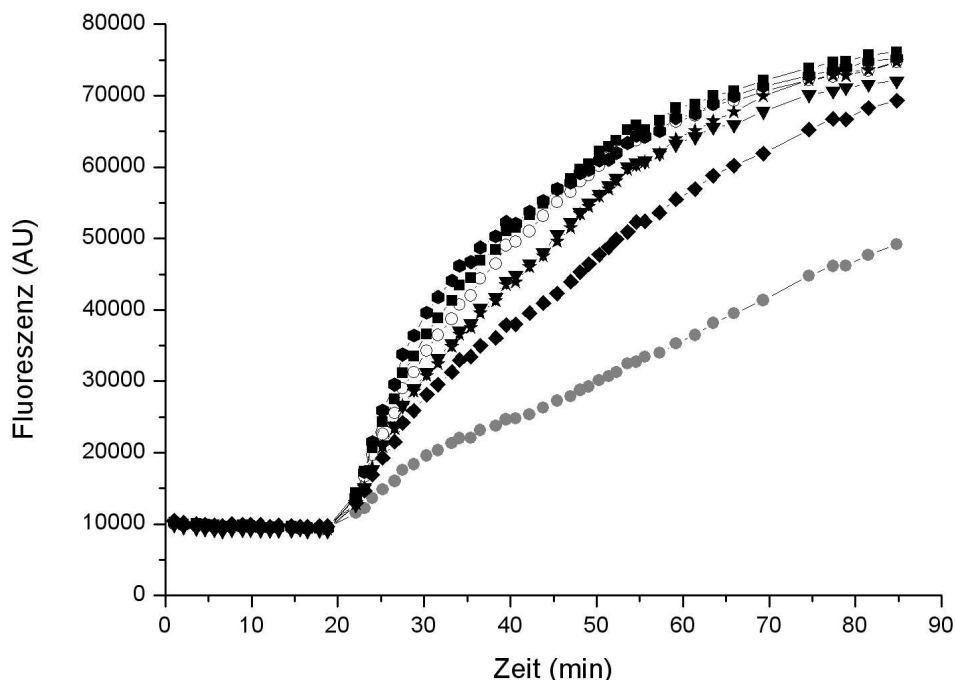
**Abbildung 3-1: Fluoreszenzfärbung nach Melophlin-Behandlung**

Zellkerne (blau) und Actinfilamente (grün) von PtK2-Zellen nach der Behandlung mit MeOH (A),  $20 \mu\text{g/ml}$  Melophlin A (B) und Melophlin G (C) für 2 h; Maßstabsbalken  $50 \mu\text{m}$

Bis auf die in Abbildung 3-1 dargestellten Ausnahmen von Melophlin A und G ließen sich nach einigen Stunden keine phänotypischen Veränderungen feststellen. Nach

1-2 d traten in einigen Fällen allgemeine toxische Effekte auf, die an der Ablösung der Zellen zu erkennen waren. Bei den Melophlinen A und G hingegen konnte bereits nach 2 h ein Effekt auf die Actinfilamente beobachtet werden (Abbildung 3-1). Die Actinfilamente waren nicht mehr so gerade und geordnet wie in den Kontrollzellen. Dieser Effekt nahm nach längerer Inkubation noch zu. Nach spätestens einem Tag waren die Zellen komplett abgelöst.

Die Fluoreszenzfärbungen deuteten auf einen Effekt der Melophline auf die Actinfilamente hin. Es wurden Actin-Polymerisations- und -Depolymerisations-Versuche durchgeführt, um den Effekt genauer zu untersuchen. Das Ergebnis der Untersuchung zur Actin-Polymerisation ist in Abbildung 3-2 zu sehen.

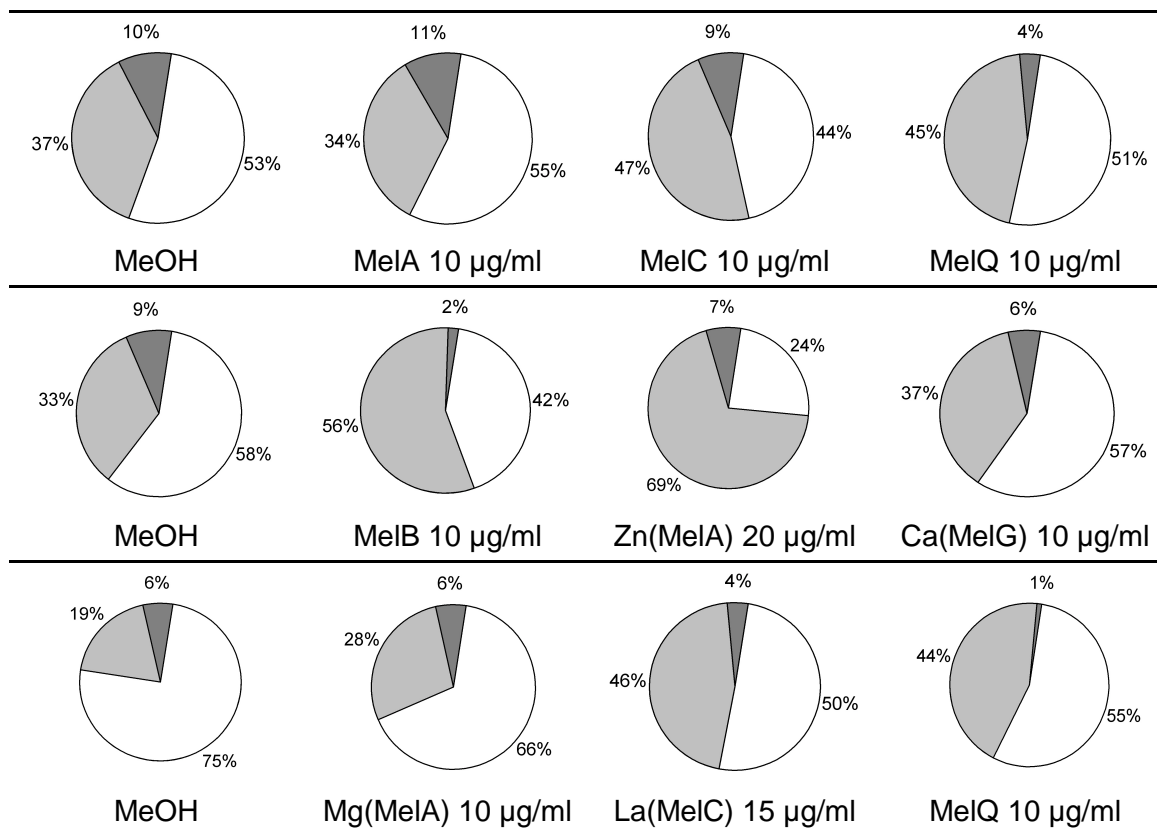


**Abbildung 3-2: Einfluss der Melophline auf die Actin-Polymerisation**

Zugabe des Polymerisations-Puffers nach 21 min; MelA (■), Ca(MelA) (◆), Mg(MelA) (▼), Zn(MelA) (★), MelG (●), alle 30  $\mu$ M; Kontrollen: MeOH (○), Cytochalasin D 10  $\mu$ M (●)

Als Standard wurde Cytochalasin D eingesetzt, das eine deutliche Inhibierung der Actin-Polymerisation zeigte. Dies war bei den Melophlinen nicht der Fall. Hier wurde lediglich bei den Komplexen von Melophlin A eine minimale Hemmung gemessen. Auch im Depolymerisations-Test ließ sich kein deutlicher Einfluss der Melophline auf das F-Actin feststellen (nicht dargestellt).

Zur weiteren Evaluierung der biologischen Wirkmechanismen der Melophline wurden mit einigen Verbindungen Zellzyklusuntersuchungen durchgeführt. Dazu wurden Mausfibroblasten (L-929) verwendet. In Abbildung 3-3 sind die Ergebnisse aus drei verschiedenen Versuchen dargestellt. Zu sehen sind jeweils die prozentualen Anteile der G0/1-, S- und G2/M-Phasen nach einer 1-tägigen Inkubation mit den Proben.



**Abbildung 3-3: Zellzyklusuntersuchungen einiger Melophline und Melophlin-Komplexe**

Drei verschiedene Versuchsansätze nach 1 d Inkubation; G0/1-Phase: weiß, S-Phase: hellgrau, G2/M-Phase: dunkelgrau

Vor allem im Ansatz der unteren Reihe weichen die Werte der MeOH-Kontrolle von denen der beiden anderen Versuche ab, was vermutlich auf zu dicht gewachsene Zellen zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Unterschiede sollten die Ergebnisse mit den Melophlinen immer mit den MeOH-Kontrollen des gleichen Versuchsansatzes verglichen werden. Es fällt auf, dass in einigen Fällen die Anzahl der Zellen, die sich in der S-Phase befanden, im Vergleich zur Kontrolle erhöht war. Im Ansatz der oberen Reihe war dies für Melophlin C und Q in geringem Maße zutreffend, mit 10 % bzw. 8 % mehr Zellen in der S-Phase als in der Kontrolle. Beim mittleren Ansatz war ein verlängerter Aufenthalt der Zellen in der S-Phase bei Melophlin B mit 56 % und

Zn(MelA) mit 69 % im Vergleich zu 33 % in der MeOH-Kontrolle zu beobachten. Im untersten Versuch war der Effekt bei La(MelC) und MelQ deutlich, bei Mg(Mel A) etwas schwächer erkennbar.

### 3.1.1.2 Raveninsäure-, Aburatubolactam- und Macrocidin-Fragmente

Eine den Melophlinen verwandte Verbindung ist die Raveninsäure (Rav402), die eine mehrfach ungesättigte aliphatische Seitenkette trägt. Hier wurde auch die der Raveninsäure ähnliche Verbindung Rav369 getestet, deren Seitenkette unverzweigt und stärker gesättigt ist. Von den komplexeren macrocyclischen Tetransäuren Aburatubolactam und Macrocidin konnten nur Teilstrukturen untersucht werden, da diese Naturstoffe bis zum Abschluss der Dissertation nicht als komplette Moleküle vorlagen. Die Ergebnisse der Agardiffusions- und Proliferationstests von Rav402 und Rav369 sowie der Aburatubolactam- und Macrocidin-Fragmente Abu527, Mac600-15, Mac600-17 und Mac600-22 sind in Tabelle 3-5 und Tabelle 3-6 gezeigt.

**Tabelle 3-5: Agardiffusionstests einiger Tetransäuren**

Angaben der Hemmhöhe (mm)

	ToIC	Kbp	Psa	Sta	Mcl	Myp	Caa	Hna	Scs	Asn	Boc	Pyd
Rav369	0	0	0	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	0	0	0	0	0	0
Rav402	0	0	0	<b>11</b>	0	<b>9</b>	0	0	0	0	0	0
Abu527	0	0	0	<b>8</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
Mac600-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mac600-17	<b>10</b>	0	0	0	0	<b>8</b>	0	0	0	0	0	0
Mac600-22	0	0	0	0	<b>7</b>	<b>8</b>	0	0	0	0	0	0

Wie die Melophline zeigten auch die anderen hier getesteten Tetransäuren keine hemmende Wirkung auf das Wachstum der Hefen und Hyphenpilze. Die einzigen – wie bei den Melophlinen eher kleinen – Hemmhöfe waren bei grampositiven Bakterienspezies festzustellen, mit der Ausnahme von Mac600-17, welches auch bei *E. coli* ToIC zu einem 10 mm-Hemmhof führte.



**Tabelle 3-6: Proliferationstests einiger Tetramsäuren**

Angaben der  $IC_{50}$ -Werte ( $\mu M$ ); Bestimmung der P-Glycoprotein-Affinität

	L-929	KB-3-1	A-498	U-937	PtK2	HUV.	KB-V1 ohne/ mit Vp.	P-GP- Affin.
Rav369	39	21	25	11	11	6,5	21/13	1,6
Rav402	66	58	81	31	77	154	7,3/8,5	0,9
Abu527	4,0	2,0	0,93	0,81	0,69	1,6	0,12/0,53	0,2
Mac600-15	25	8,0	13	14	n.d.	2,5	6,5/4,0	1,6
Mac600-17	41	16	13	70	n.d.	19	25/25	1,0
Mac600-22	22	7,3	12	22	n.d.	n.d.	n.d./ n.d.	-

Die Raveninsäure Rav402 zeigte in allen getesteten Zelllinien eine etwas geringere proliferationshemmende Wirkung als das Raveninsäure-Fragment Rav369. Das Aburatubolactam-Fragment Abu527 war in dem Vergleich dieser Tetransäuren die wirksamste Verbindung. Zwischen den Macrocidin-Fragmenten waren keine großen Unterschiede festzustellen, lediglich Mac600-17 war etwas weniger wirksam als die beiden anderen Fragmente Mac600-15 und Mac600-22. Keine der in diesem Abschnitt getesteten Verbindungen zeigte eine verringerte Aktivität in der primären Zelllinie im Vergleich zu den transformierten Zelllinien. Es wurde keine deutliche Affinität zur Effluxpumpe festgestellt.

### 3.1.2 Chivosazole A und F, S522

Die zweite Gruppe von untersuchten Verbindungen waren Naturstoffe aus Myxobakterien. Auch sie wurden biologisch mit dem Standardtestsatz charakterisiert.

In Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8 sind die Ergebnisse der Agardiffusionstests sowie der Proliferationstests der Chivosazole A und F sowie der Verbindung S522 dargestellt.

**Tabelle 3-7: Agardiffusionstests der Chivosazole A und F sowie von S522**

Angaben der Hemmhöfe (mm)

[illegible]

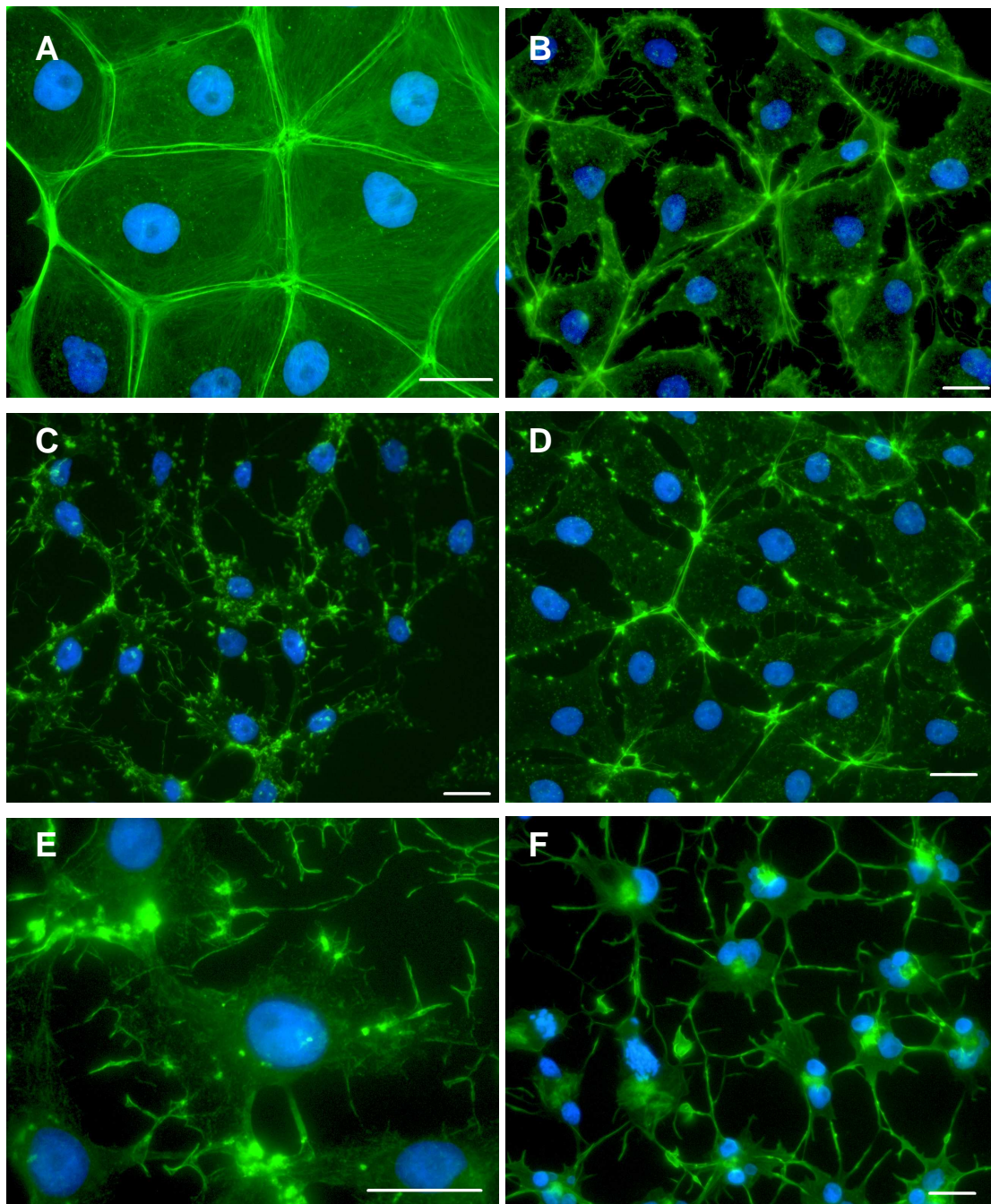
**Tabelle 3-8: Proliferationstests der Chivosazole A und F sowie von S522**Angaben der  $IC_{50}$ -Werte (nM); Bestimmung der P-Glycoprotein-Affinität

	L-929	KB-3-1	A-498	U-937	PtK2	HUV/ HNV.	KB-V1 ohne/ mit Vp.	P-GP- Affinität
Chi. A	4,0	3,5	0,81	3,5	12	n.d./0,92	4,6/2,1	2,2
Chi. F	29	44	3,0	4,7	58	n.d./2,9	29/4,3	6,7
S522	14	9,6	33	19	n.d.	1,1/n.d.	13/17	0,8

Mit Ausnahme des 10-mm-Hemmhofes von Chivosazol A bei *E. coli* TolC zeigte keine der drei hier untersuchten Verbindungen einen Effekt auf die Bakterien. Bei den Hefen und Hyphenpilzen war jedoch nach der Behandlung mit den Chivosazolen eine deutliche Inhibierung des Wachstums zu erkennen, die mit Hemmhöfen von z. B. 27 mm bei *A. niger* im Bereich des kommerziell erhältlichen Antimykotikums Nystatin lagen (29 mm im gleichen Testansatz).

Bei den Proliferationstests muss beachtet werden, dass die  $IC_{50}$ -Werte hier in nM angegeben sind. Die Verbindungen waren also ca. 1000-fach wirksamer als die Tetransäuren und damit ebenso wirksam wie die in Tabelle 3-2 beispielhaft gewählten Naturstoffe. Die Werte lagen zwischen 0,81 und 58 nM, wobei Chivosazol A effektiver war als Chivosazol F. S522 befand sich ebenfalls im nanomolaren Bereich. Bei Chivosazol F ergab sich für die Affinität zum P-Glycoprotein ein Faktor von 6,7. Bei Chivosazol A und S522 lag dieser Wert mit 2,2 bzw. 0,8 nicht im auffälligen Bereich. Keine der drei Verbindungen zeigte einen höheren antiproliferativen Effekt auf die transformierten als auf die primären Zelllinien.

Für phänotypische Untersuchungen wurden die Actinfilamente von PtK2-Zellen nach der Behandlung mit den Chivosazolen fluoreszenzgefärbt. Wie in Abbildung 3-4 (B und D) zu erkennen, konnten bereits nach 15 min die ersten Veränderungen festgestellt werden. Die Actinfilamente zeigten, vor allem im Zellcortex, stärker fluoreszierende Punkte. Nach längeren Inkubationszeiten nahm dieser Effekt noch zu und das ganze Actincytoskelett löste sich auf. Nach 20 h Behandlung mit den Chivosazolen lagen vermehrt Zellen mit zwei Zellkernen vor und die Actinfilamente waren nicht mehr als solche zu erkennen.

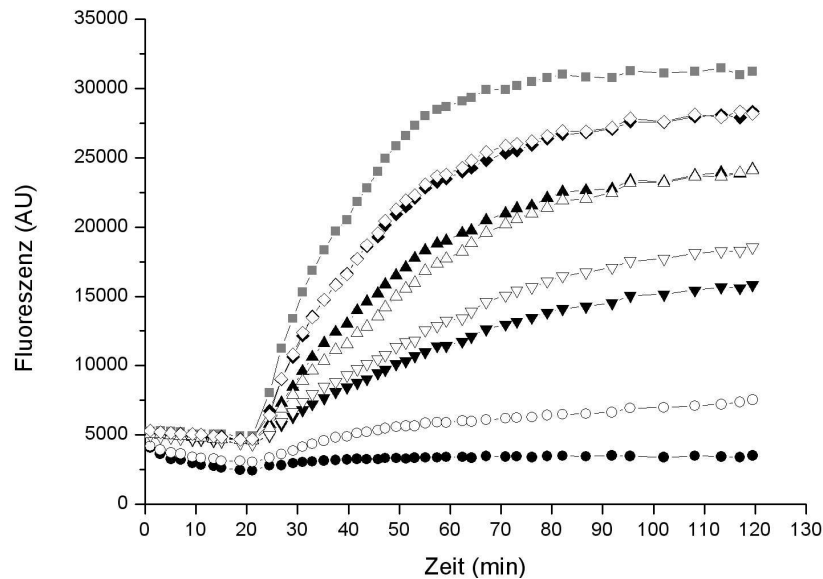


**Abbildung 3-4: Fluoreszenzfärbung nach Chivosazol-Behandlung**

Zellkerne (blau) und Actinfilamente (grün) von PtK2-Zellen nach der Behandlung mit MeOH (A), 100 nM Chivosazol A für 15 min (B) und 30 min (C), 300 nM Chivosazol F für 15 min (D), 30 min (E) und 20 h (F); Maßstabsbalken: 20  $\mu$ M

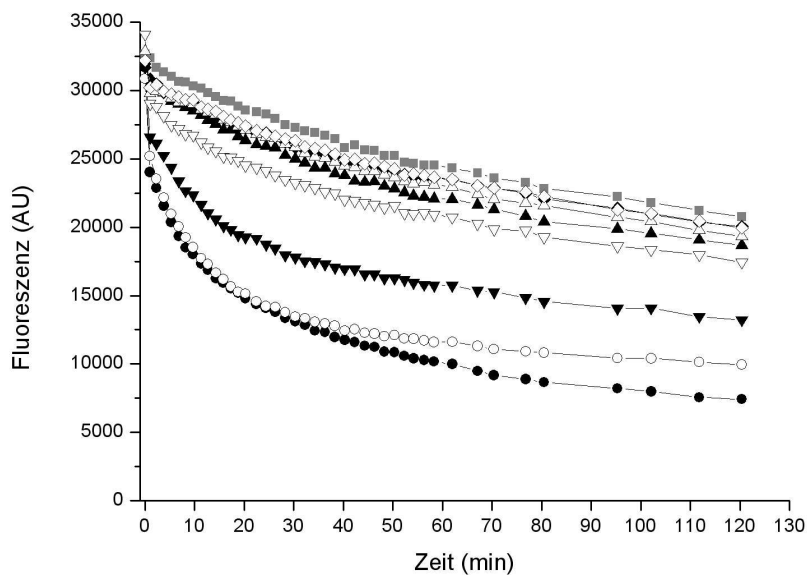
Aufgrund der phänotypischen Untersuchungen konnte ein Einfluss der Chivosazole auf das Actin vermutet werden, darum wurde des Weiteren untersucht, ob es sich hierbei um einen direkten Effekt handelte, die Chivosazole also direkt an die Actinmonomere banden. Dafür wurden *in vitro* (De)Polymerisationsassays

durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-5 (Polymerisation) und Abbildung 3-6 (Depolymerisation) dargestellt.



**Abbildung 3-5: Einfluss der Chivosazole auf die Actin-Polymerisation**

Zugabe des Polymerisations-Puffers nach 22 min; Chivosazol A: schwarze Symbole, Chivosazol F: weiße Symbole; ◆, ◇ 1  $\mu\text{M}$ ; ▲, △ 2  $\mu\text{M}$ ; ▼, ▽ 4  $\mu\text{M}$ ; ●, ○ 8  $\mu\text{M}$ ; MeOH: ■



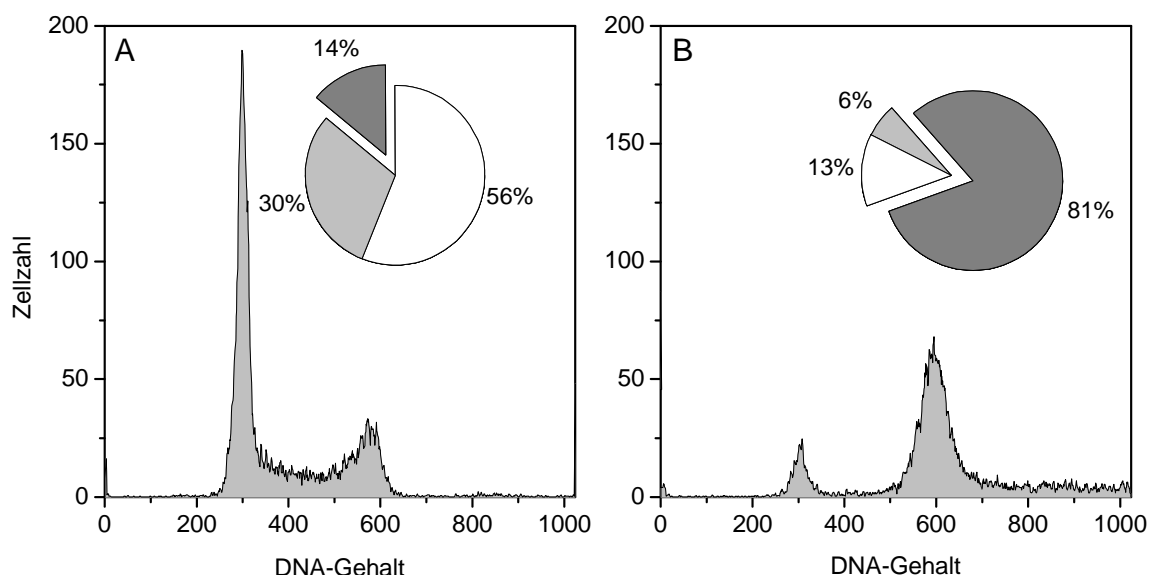
**Abbildung 3-6: Einfluss der Chivosazole auf die Actin-Depolymerisation**

Chivosazol A: schwarze Symbole, Chivosazol F: weiße Symbole; ◆, ◇ 1  $\mu\text{M}$ ; ▲, △ 2  $\mu\text{M}$ ; ▼, ▽ 4  $\mu\text{M}$ ; ●, ○ 8  $\mu\text{M}$ ; MeOH: ■

Beide Chivosazole hemmten die Polymerisation des pyrenmarkierten G-Actins, was an einer verringerten Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen war. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig; in den höheren Konzentrationen (4 und 8  $\mu\text{M}$ ) war Chivosazol A etwas effektiver als Chivosazol F.

In den Depolymerisationsassays wurden die Chivosazole zu polymerisiertem F-Actin gegeben, das im Laufe der Zeit langsam depolymerisierte, wenn kein Polymerisationspuffer zugegeben wurde. Die Chivosazole beschleunigten diesen Prozess, erneut Chivosazol A etwas stärker als Chivosazol F.

Wie die Zellzyklusanalysen in Abbildung 3-7 zeigen, war nach einer 1-tägigen Inkubation von L-929-Zellen mit 200 ng/ml (= 289 nM;  $\sim \text{IC}_{90}$ ) Chivosazol F der Anteil an Zellen in der G2/M-Phase mit 81 % deutlich höher als in der Lösemittel-Kontrolle (14 %). Das deutete auf eine verzögerte Zellteilung hin.

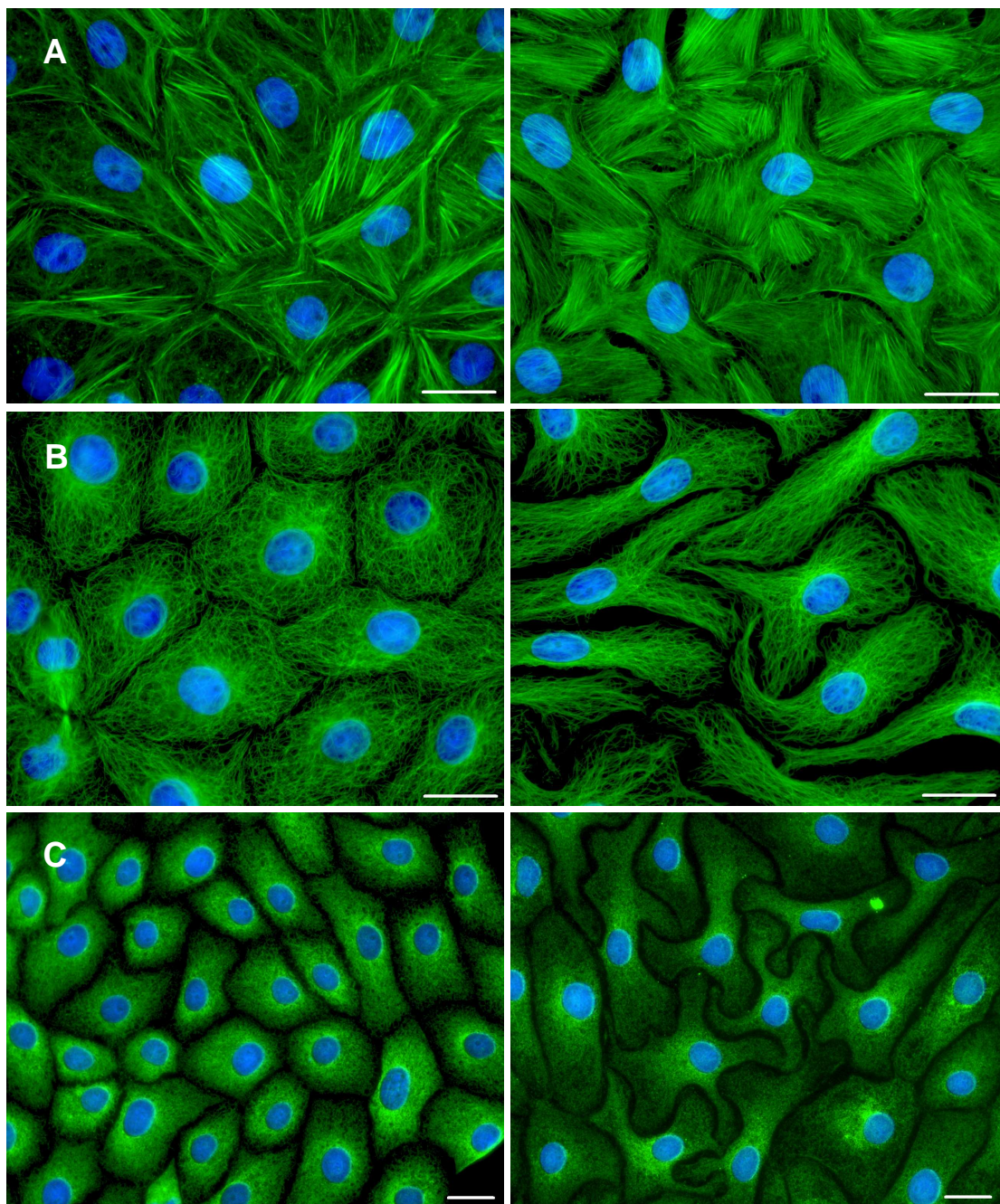


**Abbildung 3-7: Einfluss von Chivosazol F auf den Zellzyklus**

Zellzyklusuntersuchungen von L-929-Zellen mit MeOH (A) und 200 ng/ml Chivosazol F (B) nach 1 d Inkubation; Histogramme: einfacher DNA-Gehalt = G0/1-Phase bei 300, doppelter DNA-Gehalt = G2/M-Phase bei 600, S-Phase dazwischen; Tortendiagramme: G0/1-Phase: weiß, S-Phase: hellgrau, G2/M-Phase: dunkelgrau

Die phänotypischen Untersuchungen von S522 zeigten verschlungene PtK2-Zellen, die nicht wie unbehandelte Zellen kopfsteinpflasterartig nebeneinander wuchsen. Dieser Effekt trat erst nach einer mindestens eintägigen Inkubation mit S522 auf und ist in Abbildung 3-8 dargestellt.





**Abbildung 3-8: Fluoreszenzfärbung nach S522-Behandlung**

Zellkerne (blau) und Actinfilamente (A), Mikrotubuli (B) und Endoplasmatisches Reticulum (C) (grün) von PtK2-Zellen nach der Behandlung mit MeOH (links) und 50 ng/ml S522 (rechts) für 4 d; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m

### 3.1.3 Prismaticin, Plumericin, Isoplumericin

Die dritte Gruppe der Naturstoffe waren Iridoide, die aus Pflanzen isoliert wurden. In Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10 sind die Effekte der drei Verbindungen Prismaticin, Plumericin und Isoplumericin auf den Standardtestsatz der Mikroorganismen und Zellkulturen gezeigt.

**Tabelle 3-9: Agardiffusionstests mit Prismatomerin und (Iso)Plumericin**

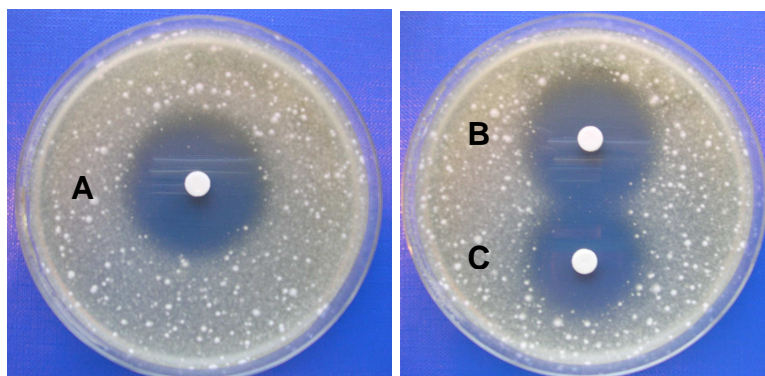
Angaben der Hemmhöfe (mm)

	TolC	Kbp	Psa	Sta	Mcl	Myp	Caa	Hna	Scs	Asn	Boc	Pyd
Prismatomerin	<b>9</b>	0	0	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>28</b>	<b>36</b>	<b>32</b>
Plumericin	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>26</b>	<b>29</b>
Isoplumericin	<b>7</b>	0	0	0	0	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>30</b>	<b>34</b>	<b>34</b>

**Tabelle 3-10: Proliferationstests mit Prismatomerin und (Iso)Plumericin**Angaben der  $IC_{50}$ -Werte ( $\mu M$ ); Bestimmung der P-Glycoprotein-Affinität

	L-929	KB-3-1	U-937	PtK2	HUVEC	KB-V1 ohne/ mit Vp.	P-GP- Affinität
Prismatomerin	0,27	0,50	0,087	0,22	0,27	0,60/0,35	1,7
Plumericin	0,92	1,2	0,67	3,9	1,3	4,1/3,5	1,2
Isoplumericin	0,41	1,2	0,27	2,0	0,62	3,1/4,5	0,7

Beim Vergleich dieser drei Substanzen zeigte Prismatomerin sowohl in den mikrobiologischen Tests als auch in den Zelltests die höchste Effektivität. Die biologische Wirkung von Isoplumericin im Vergleich zu Prismatomerin war etwas niedriger; Ersteres zeigte bei weniger Bakterienspezies Effekte und die  $IC_{50}$ -Werte waren in allen Fällen höher. Plumericin hatte keinen Effekt auf die Bakterien und wies in dieser Substanzgruppe die höchsten  $IC_{50}$ -Werte bei Säugerzellen auf. Bei allen drei Verbindungen waren besonders die Hemmhöfe im Wachstum der Hyphenpilze auffällig. In fast allen Fällen hatten sie einen größeren Durchmesser als das Antimykotikum Nystatin (vgl. Tabelle 3-1: Asn 29 mm, Boc 22 mm, Pyd 17 mm).

**Abbildung 3-9: Hemmung des Wachstums von Pythium debaryanum**

Hemmhöfe nach eintägiger Inkubation mit Prismatomerin (A), Isoplumericin (B) und Plumericin (C)

Die IC<sub>50</sub>-Werte mit den primären Zellen lagen im gleichen Bereich wie die Werte der anderen Zelllinien. Es wurde keine hohe Affinität zum ABC-Transporter festgestellt.

## 3.2 High-Content Analyse

Nach der allgemeinen biologischen Charakterisierung sollte versucht werden, mehr Informationen zum Wirkmechanismus der Verbindungen zu gewinnen. Dies kann oft eine schwer zu lösende Aufgabe sein, für die es keinen Standardweg gibt. Eine moderne Herangehensweise an dieses Problem ist die High-Content Analyse. Hierbei werden phänotypische Änderungen, die durch die aktiven Verbindungen hervorgerufen werden, über Bildanalyse und statistische Methoden ausgewertet.

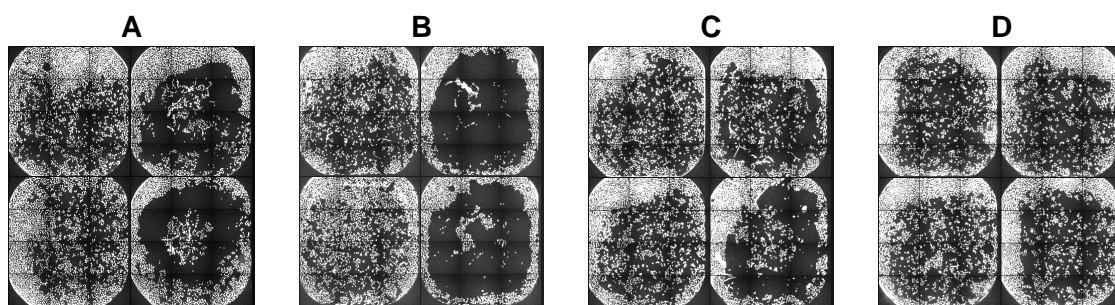
### 3.2.1 Etablierung/Optimierung

Um die High-Content Analyse als Methode zu etablieren, mussten mehrere Teile des Arbeitsprozesses optimiert werden. Die Ergebnisse dieser Optimierungen sind im Folgenden dargestellt.

#### 3.2.1.1 Entfernen der Flüssigkeiten aus den Wells

Generell werden MTP-96 in der Praxis oft ausgeschlagen, um die Flüssigkeiten zu entfernen. Bei MTP-384 ist dies weniger üblich. In diesem Teil der Optimierung der HCA wurden vier verschiedene Methoden zur Entfernung der Flüssigkeiten aus den Wells miteinander verglichen: das Absaugen mit einer Vakuum-Absaugpumpe, langsames Absaugen mit einer Mehrkanalpipette, Abzentrifugieren und Ausschlagen.

Dazu wurden PtK2-Zellen verwendet. In Abbildung 3-10 sind repräsentative Wells nach verschiedenen Behandlungsmethoden dargestellt.



**Abbildung 3-10: Vergleich von Methoden zum Entfernen der Flüssigkeiten**

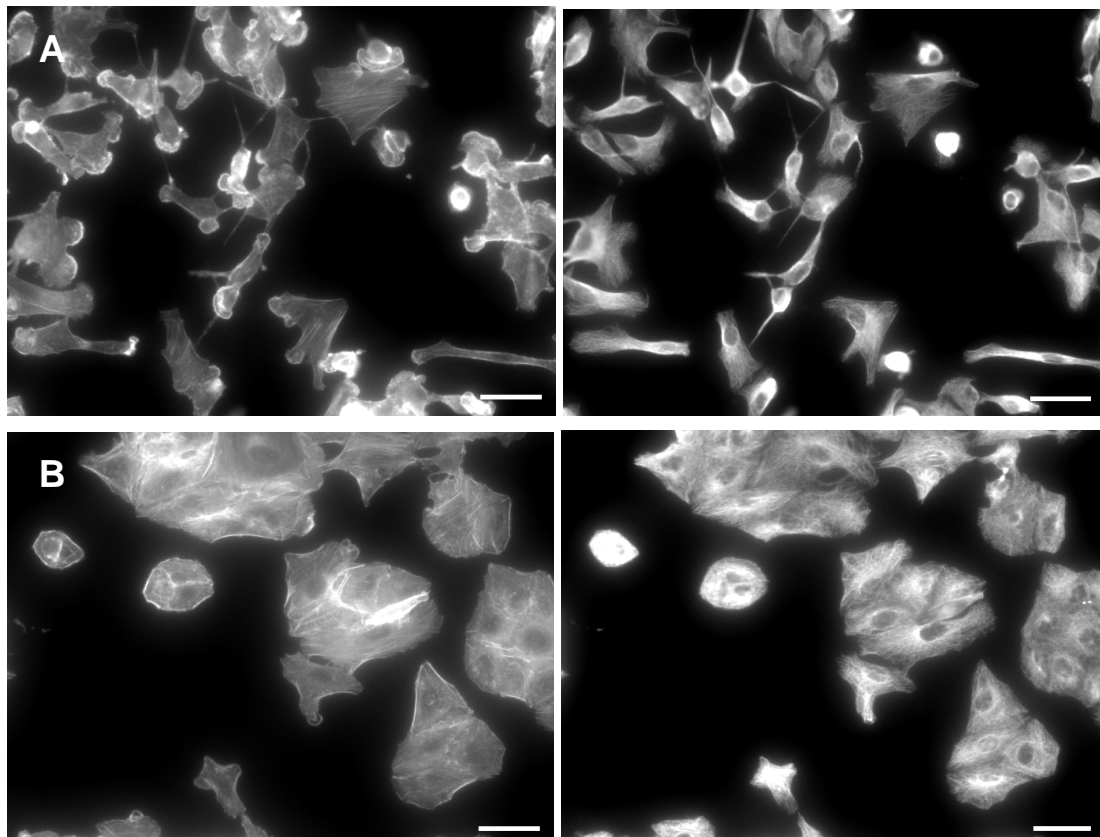
Dargestellt sind die Zellkerne von je vier Wells pro Ansatz nach MeOH- (A-D jeweils links) und nach Formalin-Fixierung (rechts). Dabei wurden verschiedene Methoden verwendet, um die Flüssigkeiten aus den Wells zu entfernen: Absaugen mit einer Vakuum-Saugvorrichtung (A) oder einer Mehrkanal-Pipette (B), Abzentrifugieren (C) und Ausschlagen (D).

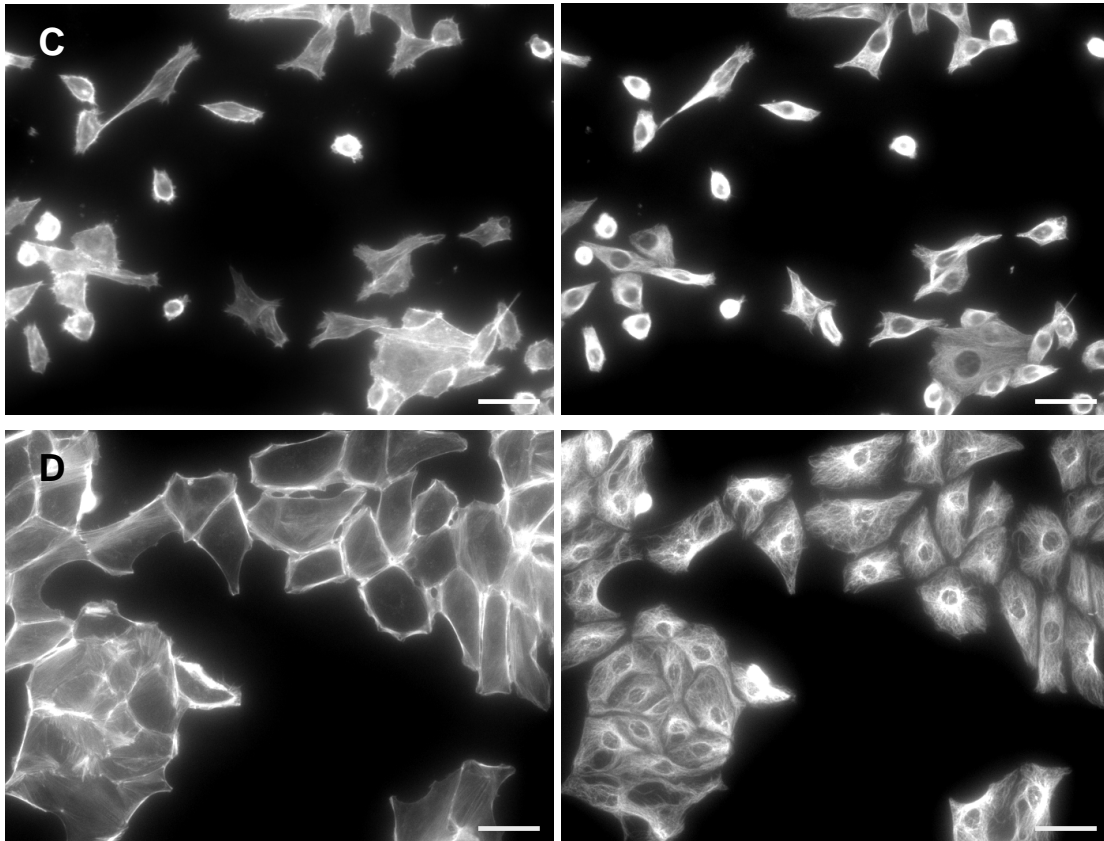


Für alle Ansätze gilt, dass die MeOH-Fixierung deutlich besser war als die Formalin-Fixierung. Für letztere eignete sich das Absaugen der Zellen nicht, weder mit Vakuumpumpe noch mit einer Mehrkanalpipette. Abzentrifugieren der Flüssigkeiten erwies sich als etwas schonender für die Zellen, hier waren in den meisten Wells noch mehr Zellen adhärent. Am besten eignete sich das Ausschlagen der MTP. Hier konnten kaum Wascheffekte festgestellt werden. Es waren noch annähernd so viele Zellen adhärent wie nach der MeOH-Fixierung.

### 3.2.1.2 Zelllinie

Es wurden vier transformierte Zelllinien auf ihre Anwendungsmöglichkeit in der HCA untersucht: drei humane Zelllinien, A-498, A-549 und KB-3-1, die aus unterschiedlichen Tumorgeweben stammen (Nierenkrebs, Lungenkrebs und Cervixkarzinom), und die Kaninchenkänguru-Zelllinie PtK2-Zellen, die sich aufgrund ihrer flachen Morphologie gut zur Fluoreszenzmikroskopie eignet. Zunächst wurden bei allen Zelllinien die Cytoskelettstrukturen (Actinfilamente und Mikrotubuli) sowie die Zellkerne gefärbt und mithilfe des automatischen Mikroskops Bilder erstellt. Eine repräsentative Auswahl ist in Abbildung 3-11 dargestellt.

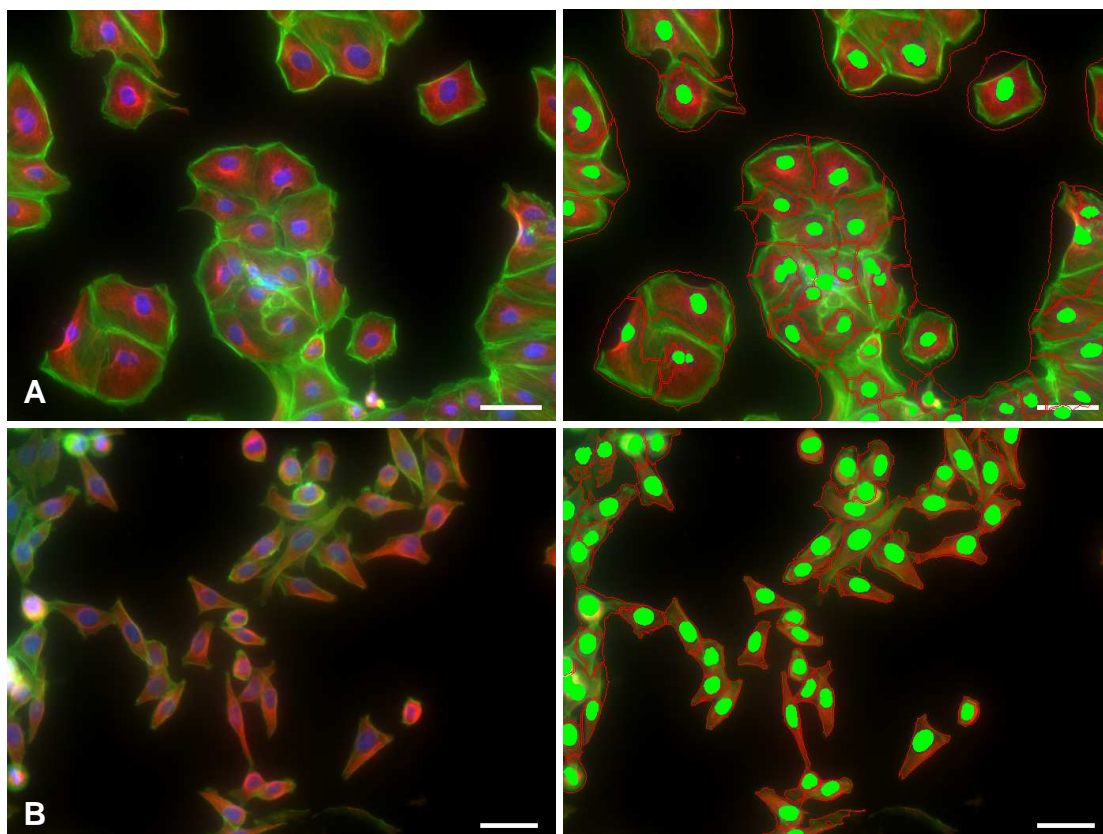




**Abbildung 3-11: Vergleich verschiedener Zelllinien**

Färbung der Actinfilamente (links) und der Mikrotubuli (rechts) bei A-498- (A), A-549- (B), KB-3-1- (C) und PtK2-Zellen (D); Aufnahme der Bilder mit dem automatischen Mikroskop ImageXpress Micro; Maßstabsbalken: 50  $\mu\text{m}$

Bei allen vier getesteten Zelllinien waren die Cytoskelettstrukturen gut zu erkennen, am deutlichsten bei den PtK2-Zellen. Diese haben allerdings, genauso wie die A-549, einen großen Nachteil: Sie wachsen in Kolonien. Dies hat einen großen Einfluss auf die Auswertung der Bilder, da die Grenzen der Zellen nicht klar erkannt werden und so Fehler bei der Segmentierung auftreten, wie in Abbildung 3-12 zu erkennen ist.



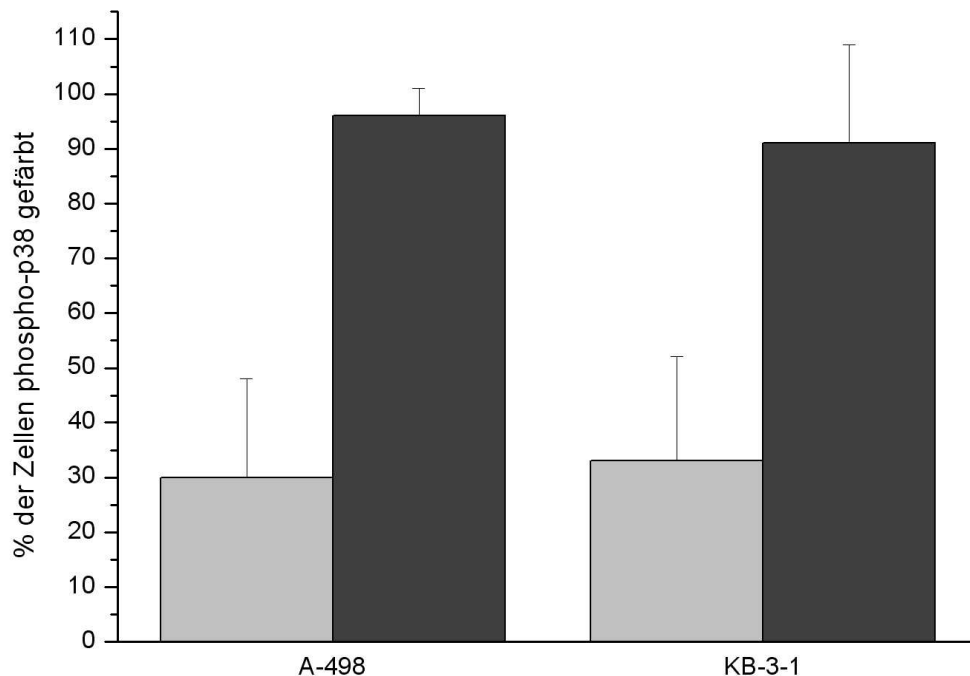
**Abbildung 3-12: Segmentierung der Bilder verschiedener Zelllinien**

Färbung der Zellkerne (blau), der Actinfilamente (grün) und der Mikrotubuli (rot) von PtK2- (A) und KB-3-1-Zellen (B) ohne (links) und mit (rechts) Segmentierungsmaske (Zellkerne: grün, Zellumrisse: rot); Bilder mit IXM erstellt; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m

Die grün abgebildeten Actinfilamente repräsentieren deutlich die Grenzen der PtK2-Zellen (A, links). Die durch die Software erkannten Umriss sind mit den roten Linien gekennzeichnet (rechts). Die Erkennung ist bei den KB-3-1-Zellen deutlich besser, wie in Abbildung 3-12 (B) zu beobachten ist. Auch bei den KB-3-1-Zellen wird die Segmentierung jedoch mit zunehmender Zelldichte ungenauer, wie am linken Rand der Bilder in (B) zu sehen ist.

Die PtK2- und A-549-Zellen waren aufgrund ihres Wachstumsverhaltens für die Verwendung in der HCA ungeeignet und wurden nicht weiter berücksichtigt. Auch die A-498- und die KB-3-1-Zellen wiesen Nachteile auf, die aber vergleichsweise gering waren. Die Nierenkrebszellen wuchsen deutlich langsamer als die anderen getesteten Zelllinien. Das machte die Vorbereitungen der HCA zeitaufwändiger. Die Cervixkarzinomzellen hingegen zeigten eine deutlich geringere Adhärenz als die anderen Zelllinien. Dies wurde im weiteren Verlauf optimiert (siehe Abschnitt 3.2.1.3).

Bei den KB-3-1- und den A-498-Zellen wurde eine Färbung der phosphorylierten MAP-Kinase p38 nach der Inkubation mit Anisomycin bzw. Methanol durchgeführt. Anisomycin ist ein Inhibitor der Protein-Biosynthese und kann unter anderem MAP-Kinasen aktivieren.



**Abbildung 3-13: Anteil von detektierbarem phosphoryliertem p38 in verschiedenen Zelllinien**

Markierung von phosphoryliertem p38 in A-498- und KB-3-1-Zellen nach der Behandlung mit MeOH (■) bzw. Anisomycin (■); angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 32 Bildern je Ansatz (acht Wells mit jeweils vier erstellten Bildern)

Bei beiden getesteten Zelllinien ließ sich nach der Behandlung mit Anisomycin eine deutliche Erhöhung des prozentualen Anteils der Zellen erkennen, bei denen Phospho-p38 markiert war. Das bedeutet, dass die Kinase p38 als Reaktion auf die Zugabe des Proteinsynthesen-Inhibitors Anisomycin phosphoryliert und dadurch aktiviert wurde. Dieser Phänotypus ließ sich sowohl bei den A-498- als auch bei den KB-3-1-Zellen mithilfe des automatischen Mikroskops und der anschließenden Bildanalyse erfolgreich detektieren. Mit beiden Zelllinien wurde daher im Folgenden weiter gearbeitet.

### 3.2.1.3 Adhärenz der KB-3-1-Zellen

Die KB-3-1-Zellen eigneten sich zwar eigentlich gut für die HCA, ein Nachteil war jedoch, dass sie nach der Formalin-Fixierung weniger adhären waren als die A-498-

Zellen; durch das Waschen, Fixieren und Färben lösten sich viele Zellen ab. Dies sollte optimiert werden. Dazu wurden verschiedene Formalin-Konzentrationen miteinander verglichen (3-6 %). Es wurden jeweils vier Wells pro Ansatz fixiert. Nach der Behandlung mit 3 % Formalin waren durchschnittlich noch 139 Zellen pro Bild zu detektieren. Die Behandlungen mit 4, 5 und 6 %iger Formalin-Lösung führten zu höheren Zellzahlen: 157, 160 und 164 Zellen/Bild (relative Standardabweichung 74, 65 bzw. 60 %).

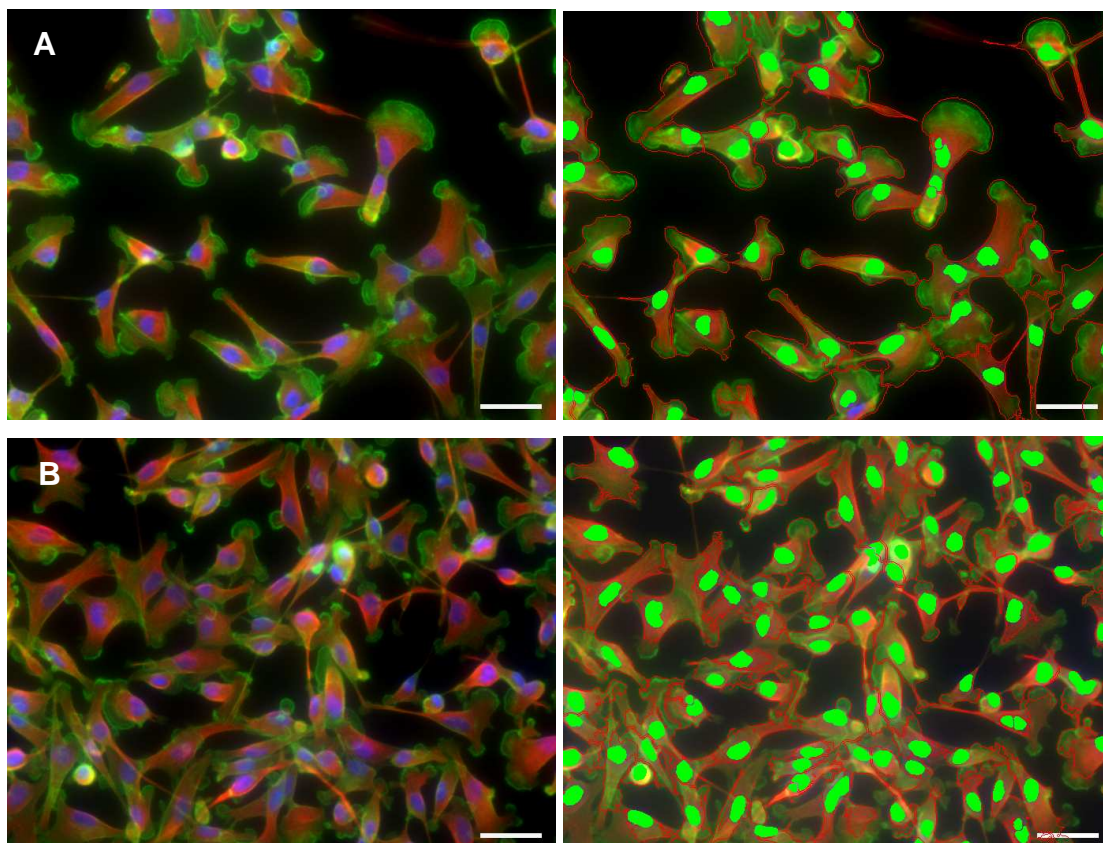
In einem anderen Ansatz wurde die Dauer der Fixierung variiert. Die Verlängerung der Behandlung zeigte eine minimale Verbesserung, hier waren nach 5, 10, 15 und 20 min im Mittel noch 638, 735, 723 bzw. 770 Zellen/Bild vorhanden (alle relativen Standardabweichungen lagen bei ca. 30 %).

Die großen Unterschiede zwischen den Zellzahlen der beiden Ansätze sind auf die Verwendung verschiedener Objektive zurückzuführen. Da zwischen den höheren Konzentrationen keine großen Unterschiede zu verzeichnen waren und 4 % die Standardkonzentration in den meisten Protokollen ist, wurde diese, zusammen mit der 20-minütigen Fixierung, in das Protokoll der HCA übernommen.

#### **3.2.1.4 Zelldichte**

Die Zelldichte spielt für die Etablierung der HCA insofern eine Rolle, als eine zu hohe Dichte Probleme bei der Segmentierung hervorruft. Es sollten jedoch auch genug Zellen vorhanden sein, um eine möglichst große Stichprobe auswerten zu können.

Für die KB-3-1- und die A-498-Zellen wurden verschiedene Zelldichten getestet und die Actinfilamente, die Mikrotubuli und die Zellkerne gefärbt. Bei beiden Zelllinien waren 3000 Z/W so dicht, dass die einzelnen Zellen nicht mehr klar als solche erkannt wurden, wie in Abbildung 3-14 am Beispiel von A-498-Zellen dargestellt ist. Es wurden bei allen folgenden Versuchen daher 2000-2500 Z/W verwendet.



**Abbildung 3-14: A-498-Zellen mit 2000 Z/W und 3000 Z/W**

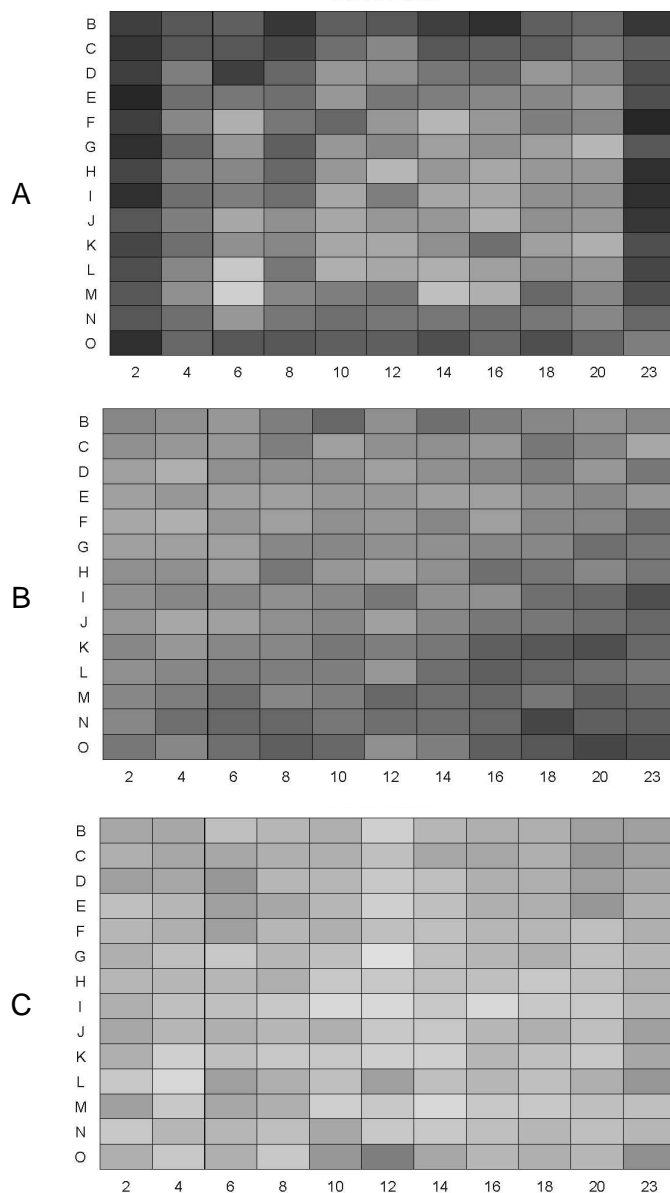
Färbung der Zellkerne (blau), der Actinfilamente (grün) und der Mikrotubuli (rot) von A-498-Zellen ohne (links) und mit (rechts) Segmentierungsmaske (Zellkerne: grün, Zellumrisse: rot); A: 2000 Z/W, B: 3000 Z/W; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m

### 3.2.1.5 Reduzierung des Randeffekts

Der Begriff „Randeffekt“ bezieht sich in dieser Arbeit darauf, dass innerhalb der einzelnen Wells mehr Zellen in solchen Bereichen zu finden waren, die sich näher am Rand der Mikrotiterplatte befanden. In der Mitte der MTP waren die Zellen gleichmäßig über das gesamte Well verteilt. Je näher jedoch das Well am Rand der Platte lag, desto ungleichmäßiger war die Verteilung der Zellen. Vor allem bei den KB-3-1-Zellen war dieser Effekt sehr ausgeprägt.

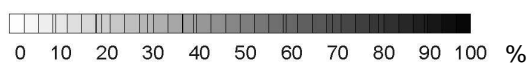
In diesem Teil der HCA-Optimierung wurden KB-3-1-Zellen direkt nach der Aussaat in Mikrotiterplatten ohne Proben auf unterschiedliche Arten vorinkubiert: für 1 h bei Raumtemperatur, dabei ein Ansatz ohne Deckel unter der sterilen Werkbank, der andere mit Deckel. Eine Platte wurde als Kontrolle nicht vorinkubiert, sondern wie sonst auch direkt bei 37 °C aufbewahrt. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Zellkerne gefärbt, in jedem Well automatisch zwölf Bilder akquiriert, die Zellzahlen be-

stimmt und daraus die Mittelwerte, Standardabweichungen und relativen Standardabweichungen errechnet. Die ungleichmäßige Verteilung der Zellen in den Wells kann durch die relative Standardabweichung der Zellzahlen für jedes Well wie in Abbildung 3-15 dargestellt werden. Je dunkler ein Well markiert ist, desto höher war die relative Standardabweichung.



**Abbildung 3-15: Verteilung von KB-3-1-Zellen nach verschiedenen Inkubationen**

Dargestellt ist die relative Standardabweichung (%) der Zellzahl (gemessen an 12 Stellen in jedem Well); A: ohne Inkubation bei RT, B: 1 h offen bei RT, C: 1 h mit Deckel bei RT





Die relative Standardabweichung in Ansatz A war vor allem im Außenbereich der Platte sehr hoch (~ 80 %) und nahm zur Mitte der Platte hin deutlich ab (~ 40 %). Das heißt, dass in den äußeren Wells die Zellen ungleichmäßiger verteilt waren als in den inneren Wells. Dieser Effekt war deutlich reduziert, nachdem die Platte vor der Inkubation bei 37 °C zunächst für 1 h ohne Deckel bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde (B). Noch weniger ausgeprägt war der Effekt in Ansatz C; hier wurde wie für B verfahren, allerdings mit Deckel. Dabei lagen die relativen Standardabweichungen in der Mitte der MTP bei 10-30 % und außen bei ca. 30-40 %. Das Verfahren C wurde daher für das Protokoll übernommen.

### 3.2.1.6 Antikörper/Farbstoffe

Auf der einen Seite sollte die Verdünnung der Antikörper (Ak)/Farbstoffe möglichst hoch sein, um Material zu sparen. Andererseits war es für die HCA wichtig, dass die Intensitäten der Färbungen hoch genug waren, um verlässliche Segmentierungen zu erhalten. Außerdem sollte ein Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Zellen zu erkennen sein. Anhand dieser Kriterien wurden die Parameter *Fixierung*, *Verdünnung* und *Inkubationszeit* für jeden Antikörper bestimmt (Tabelle 3-11).

In der endgültigen HCA sollten jeweils drei Wellenlängen pro Platte vermessen werden. Da für die Analyse die Markierung der Zellkerne essentiell war und daher in jeder Platte durchgeführt wurde, blieben noch zwei Wellenlängen für weitere Färbungen. Die Antikörper wurden deshalb in Sets zu je zwei Farbstoffen zusammengefasst und pro MTP-384 wurde dann ein Set verwendet. Da zwölf Färbungen durchgeführt werden sollten, bestand ein HCA-Ansatz also aus sechs MTP. Dabei war zu beachten, dass, wenn zwei primäre Antikörper zusammen eingesetzt wurden, diese beiden aus unterschiedlichen Spezies gewonnen wurden, um zu gewährleisten, dass die verschiedenen markierten sekundären Antikörper spezifisch nur an jeweils einen primären Antikörper binden konnten. Für die in Tabelle 3-11 in den Sets jeweils als erstes aufgelisteten Antikörper/Farbstoffe wurde der FITC-Filter verwendet; Phalloidin war schon direkt mit Alexa Fluor 488 markiert, bei den anderen Antikörpern wurden die sekundären Antikörper (anti-Ratte und anti-Kaninchen) mit einer entsprechenden Markierung verwendet. Die als zweites für jedes Set aufgeführten Antikörper wurden alle mit dem gleichen sekundären Antikörper (Atto 594 anti-Maus) und mit dem TRITC-Filter verwendet.



**Tabelle 3-11: Sets der primären Antikörper/Farbstoffe**

Angaben der optimalen Parameter für den Einsatz in der HCA; erster Antikörper/Farbstoff in jedem Set: FITC-Filter, zweiter Antikörper: TRITC-Filter; Verd.: Verdünnung; ~ Konz.: ungefähre finale Konzentration (wenn Konzentrationsangaben der Stammlösungen vom Hersteller angegeben wurden); Ink.-Dauer: Inkubationsdauer; k. U.: kein Unterschied; ü. N.: über Nacht

Set	Target	Primärer Ak/ Farbstoff	Fixierung	Verd.	~ Konz.	Ink.- Dauer.
I	Actin	Phalloidin	Formalin	1:400	17 nM	1 h
	Mikrotubuli	Maus	k. U.	1:6000	0,6 µg/ml	1 h
II	ER	Ratte	MeOH/Aceton	1:4000	-	1 h
	Cytokeratin	Maus	MeOH/Aceton	1:2000	6 µg/ml	1 h
III	Anillin	Kaninchen	k. U.	1:1000	0,2 µg/ml	1 h
	SC-35	Maus	k. U.	1:4000	1,3 µg/ml	1 h
IV	Phospho-p38	Kaninchen	Formalin	1:400	-	ü. N.
	Phospho-p44/42	Maus	k. U.	1:400	-	ü. N.
V	c-Fos	Kaninchen	Formalin	1:3000	3,5 µg/ml	1 h
	p53	Maus	k. U.	1:1600	5,8 µg/ml	1 h
VI	Phospho-CREB	Kaninchen	Formalin	1:1000	-	ü. N.
	Calmodulin	Maus	k. U.	1:400	1,3 µg/ml	1 h

Bei einigen Antikörpern spielte die Methode, mit der die Zellen zuvor fixiert wurden, keine Rolle. In diesen Fällen wurde die für den zweiten Antikörper des jeweiligen Sets besser geeignete Fixiermethode für die Mikrotiterplatte des Sets verwendet.

Für alle sekundären Antikörper ergaben sich eine Verdünnung von 1:1000 (finale Konzentrationen dann 1 oder 2 µg/ml) und eine Inkubationszeit von 1 h als angemessen. DAPI sollte 1:1000 verdünnt (dann ebenfalls 1 µg/ml) und für 10 min zu den Zellen gegeben werden.

### 3.2.1.7 Referenzsubstanzen

Um Profile von neu analysierten Verbindungen mit Profilen bekannter Verbindungen (mit bekannten Wirkmechanismen) vergleichen zu können, wurden 93 Referenzsubstanzen ausgewählt. Diese waren entweder kommerziell erhältlich oder stammten aus der Sammlung der Arbeitsgruppe. Für alle Verbindungen wurden in Proliferationstests mit der Zelllinie L-929 die IC<sub>90</sub>-Werte ermittelt. Diese Konzentration sollte in der HCA eingesetzt werden. Bei der Zugabe der Proben durch das Pintool wurden 60-70 nl

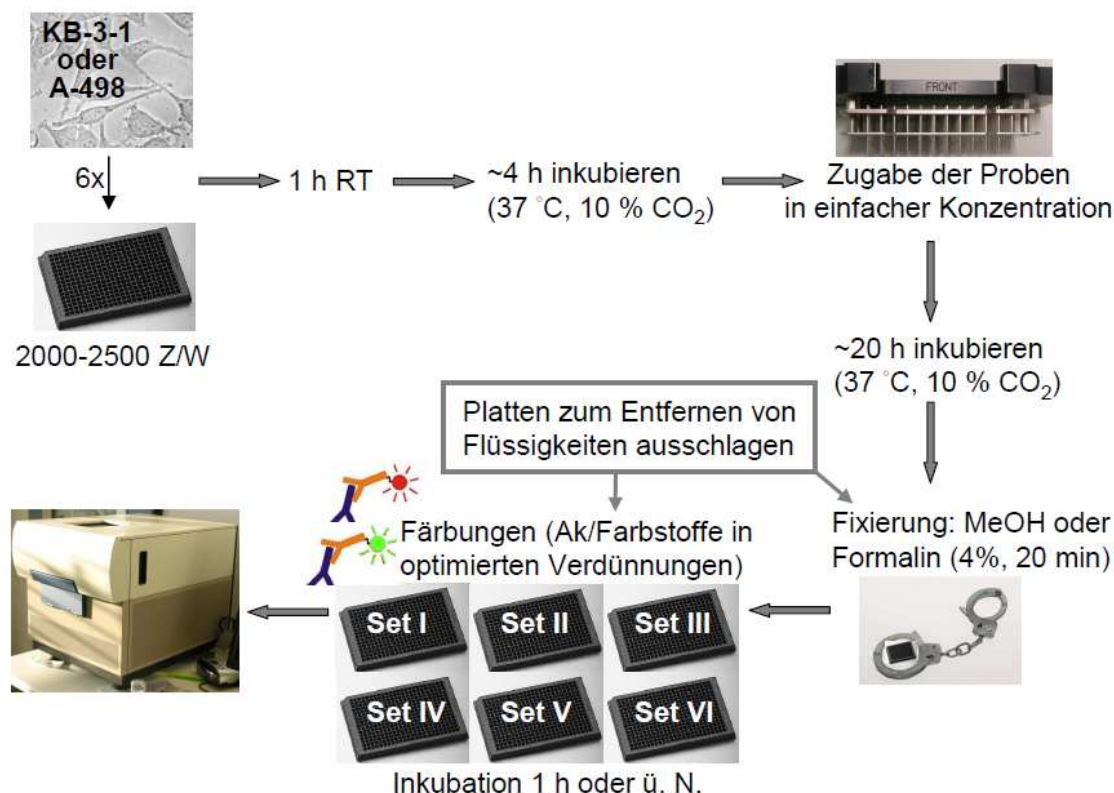
übertragen. Bei einem Medienvolumen von 60 µl entspricht dies einer Verdünnung von 1:1000. In der Substanzbank sollten die Verbindungen daher in der 1000-fachen gewünschten Endkonzentration vorliegen. Dies war nicht für alle Verbindungen möglich oder hätte in einigen Fällen sehr große Mengen an Substanz erfordert. Diese Proben wurden aus der Substanzbank entfernt, so dass 62 Referenzsubstanzen blieben. Bei einigen Verbindungen war die gewählte Konzentration zu hoch, so dass keine oder nur sehr wenige Zellen nach der Behandlung über Nacht noch adhärent waren. Diese Verbindungen wurden verdünnt und die Tests so lange wiederholt, bis für alle Verbindungen die optimalen Konzentrationen gefunden wurden. Diese sind in Tabelle 3-12 aufgelistet.

**Tabelle 3-12: Verbindungen aus der HCA-Substanzbank**

*Ermittelte optimale Konzentrationen im Test (nM)*

Name	Konzentration	Name	Konzentration
A23187	110	Mevastatin	1200
Actinomycin D	4,4	MG132	400
Alsterpaullone	1100	Myriaporon	70
Amanitin	1000	Myxothiazol A	12
Anisomycin	45	Neopeltolid	100
Aphidicolin	1000	Nocodazol	12
Apicidin	100	Okadainsäure	10
Apicularen	31	Oligomycin	70
Archazolid B	3	Oxamflatin	1200
Argyrin A	1000	PD169316	10000
Brefeldin A	100	PMA	3500
Camptothecin	450	Podophyllotoxin	2,5
Chelerythrin	1000	Puromycin	500
Chivosazol A	1,3	Purvalanol A	2000
Chondramid C	10	Rapamycin	11
Colchicin	10	Ratjadon C	3,5
Cruentaren A	14	Rhizopodin A	20
Cycloheximid	450	Saframycin Mx1	40
Cyclosporin A	5500	SB202190	10.000
Cytochalasin D	1000	SB203580	10.000
Dexamethason	4500	Scriptaid	4000
Doxorubicin	340	Simvastatin	800
Emetin	41	Soraphen A	400
Epothilon B	0,55	Staurosporin	3
Etoposid	2300	Taxol	25
Gephyronsäure A	60	Trichostatin	310
Griseofulvin	10000	Tubulysin B	0,4
H89	10000	Tunicamycin	700
Indirubin-3'-monoxim	8000	Velcade	11
LY294002	10000	Vinblastin	0,5
Methotrexat	50	Wortmannin	10000

### 3.2.1.8 Optimierte Protokoll der High-Content Analyse



**Abbildung 3-16: Optimierte Protokoll der HCA**

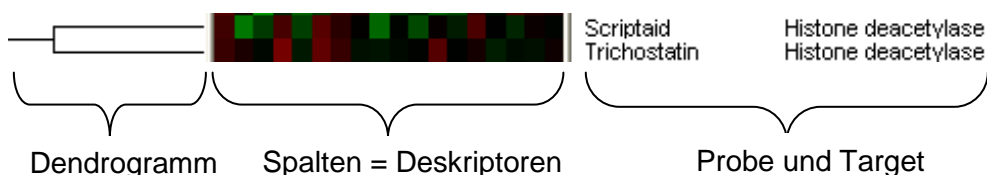
KB-3-1- oder A-498-Zellen wurden mit 2000-2500 Z/W in sechs MTP-384 eingesät und für 1 h bei RT inkubiert, gefolgt von einer mehrstündigen Inkubation im Zellinkubator. Anschließend wurden die Proben (Referenzsubstanzen und zu untersuchende Verbindungen) robotergesteuert mit einem Pintool zugegeben und die Platten dann weitere 20 h bei 37 °C inkubiert. Zur Fixierung wurden zwei verschiedene Methoden angewendet, je nach darauf folgender Färbung. Anschließend wurden die sechs Platten mit den unterschiedlichen Antikörper/Farbstoff-Sets gefärbt und automatisch Bilder akquiriert.

### 3.2.2 Allgemeines zur Auswertung und Darstellung

Die allgemeinen Grundlagen der Analyse, wie die Erstellung der charakteristischen Verbindungsprofile, sind im Kapitel „Material und Methoden“ erläutert. In diesem Abschnitt sollen daher lediglich die für das Verständnis der im Folgenden dargestellten Ergebnisse notwendigen Hintergründe erläutert, sowie die Parameter, die nicht für alle Analysen gleich waren, dargestellt werden.

Nach Evaluierung der verschiedenen Clustermethoden hat sich vor allem die hierarchische Clusteranalyse als hilfreich für die Auswertung der High-Content Analyse erwiesen. Des Weiteren wurden „Self-organizing maps“ (SOM) als Analyseverfahren verwendet. Bei beiden Methoden werden die auf den verschiedenen Deskriptoren

beruhenden Profile der einzelnen Verbindungen in „Heat Maps“ dargestellt, die entsprechend der Clusteranalyse organisiert sind. Dabei repräsentiert jede Spalte einen Deskriptor. Werte  $> 0$  sind rot und  $< 0$  grün markiert. Je größer die Abweichung, desto intensiver die Färbung. Ein Ausschnitt einer hierarchischen Clusteranalyse ist in Abbildung 3-17 beispielhaft gezeigt.



**Abbildung 3-17: Erläuterung der hierarchischen Clusteranalyse**

In der hierarchischen Clusteranalyse sind die Ähnlichkeiten der Profile aller Verbindungen in einem Dendrogramm dargestellt. Je näher die Verbindungen zusammenliegen, desto ähnlicher sind sie. Um die Ähnlichkeiten evaluieren zu können, wird ein Ähnlichkeitsmaß gewählt. In dieser Arbeit wurden dafür ausschließlich Pearsons Korrelationskoeffizient (PK) und das Abstandsmaß „Quadrat des Euklidischen Abstands“ (Euclidean Squared, ES) verwendet. Je näher diese Werte an 1 sind, desto größer ist die Korrelation der Verbindungen.

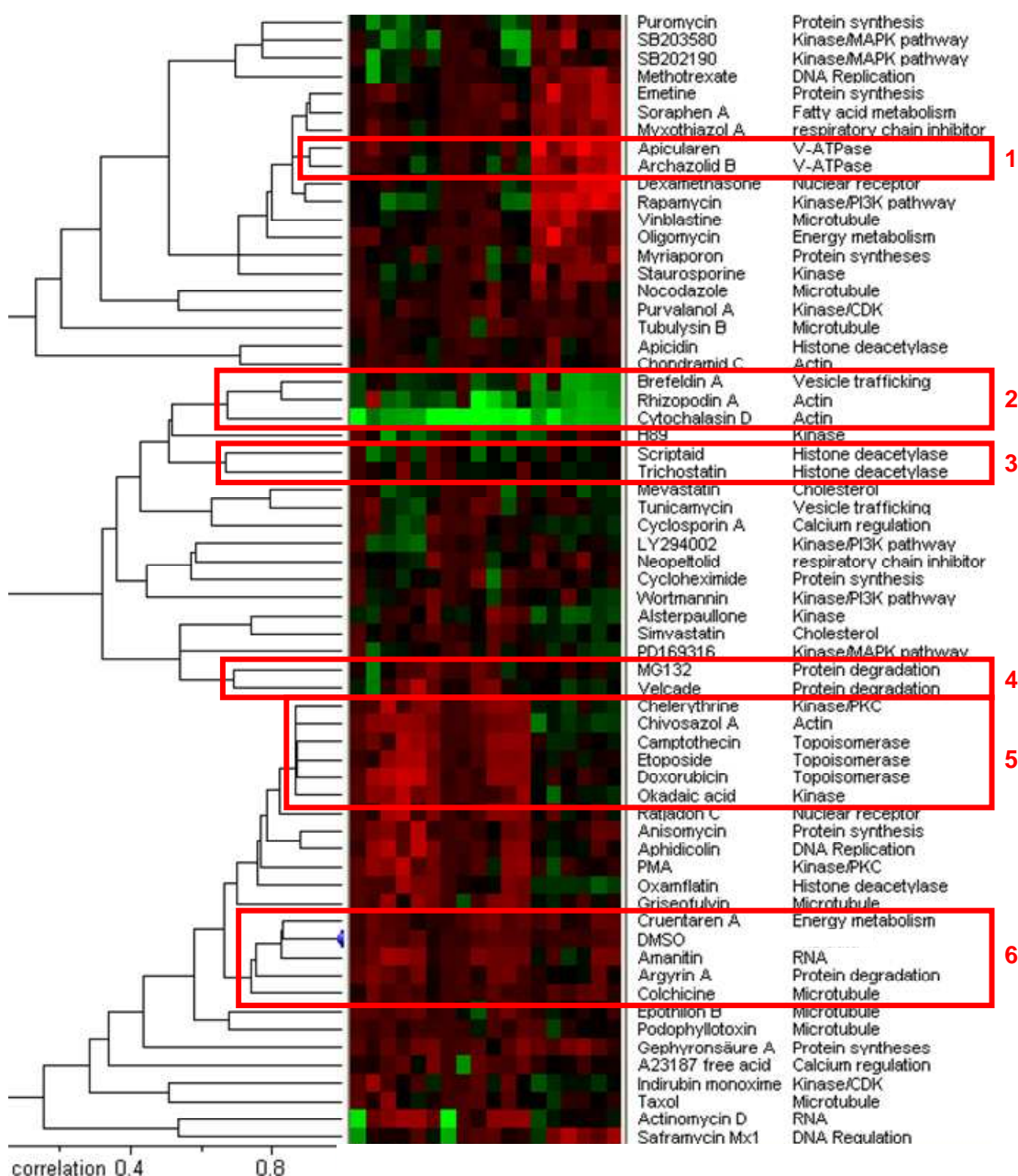
Bei den SOM werden die Verbindungen anhand der Ähnlichkeiten ihrer Profile in eine vorher manuell bestimmte Anzahl Gruppen sortiert. Diese Gruppen werden in einem 2-dimensionalen Gitter dargestellt. Dabei liegen Gruppen, deren Verbindungen sich ähnlich sind, dichter beieinander als Gruppen, deren Profile sich sehr unterscheiden. Die hier verwendeten SOM basieren immer auf dem Quadrat des Euklidischen Abstands.

Bei den im Folgenden dargestellten Ergebnissen sind alle Variablen angegeben. Dazu gehören die Zelllinie (A-498 oder KB-3-1), das Ähnlichkeitsmaß (PK oder ES) und die verwendeten Deskriptoren. Zwischen bild- und zellbasierten Datensätzen wurden keine großen Unterschiede festgestellt, deshalb werden nachfolgend, wenn nicht anders erwähnt, bildbasierte Daten für die Analyse herangezogen.

Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass die verschiedenen Cluster-Algorithmen auch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. In der Praxis kann es bei derartig komplexen Daten, wie sie die HCA liefert, zu stark abweichenden Ergebnissen kommen. So können z. B. zwei Verbindungen, die in einer Gruppe der SOM-Analyse

erscheinen, in der hierarchischen Clusteranalyse weit voneinander entfernt liegen. Außerdem sind nicht immer die Verbindungen mit den höchsten Korrelationskoeffizienten auch zwingend in einem Cluster bzw. einer Gruppe zu finden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass eventuell Ähnlichkeiten zu verschiedenen Verbindungen bestehen, welche sich wiederum nicht so stark ähneln. Jede Verbindung taucht in der Clusteranalyse aber nur ein Mal auf. In einigen Fällen ermöglichen erst die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse mit den verschiedenen Analysemethoden sowie die Berücksichtigung des PK bzw. des ES Aussagen über die Fähigkeit der High-Content Analyse und erlauben Hypothesen zum Wirkmechanismus unbekannter Proben.

### 3.2.3 HCA der Referenzsubstanzen



**Abbildung 3-18: Hierarchische Clusteranalyse der Referenzsubstanzen**

Verwendete Zelllinie: A-498; Pearsons Korrelationskoeffizient; Deskriptoren: % der Zellen, die positiv sind für die jeweilige Färbung (Spalten 1-12), Gesamtzellzahl (Spalten 13-18)

In Abbildung 3-18 sind einige Proben markiert, auf die nachstehend genauer eingegangen wird. In Beispiel 1 waren die beiden V-ATPase-Inhibitoren Apiculan und Archazolid B mit einem Korrelationskoeffizienten (PK) von 0,91 zusammen gruppiert. Im zweiten markierten Bereich befanden sich drei Verbindungen, von denen nur zwei das gleiche Target hatten. Beim Vergleich der Profile fiel auf, dass sie alle

rechts einen grünen Bereich aufwiesen. Hierbei handelte es sich um die Gesamtzellzahl. Bei diesen Proben waren sehr viele Zellen abgelöst, so dass die Zellzahl deutlich niedriger war als in den anderen Wells, was dazu führte, dass diese drei Proben in einem Cluster wiederzufinden waren. Das Ablösen der Zellen könnte auf eine adhäsionsinhibierende Wirkung der Substanzen zurückgeführt werden, die oft mit einem Einfluss auf die Actinfilamente einhergeht. Da aber auch zu hohe, zelllytische Konzentrationen der Verbindungen zum Ablösen der Zellen führen können, kann nicht zwingend ein spezifischer Effekt angenommen werden. Beispiel 3 zeigt die beiden Histon-Deacetylase-Inhibitoren Scriptaid und Trichostatin (PK 0,69). In dem Bereich 4 ist ein weiteres Cluster-Beispiel von Verbindungen mit dem gleichen Target markiert, ebenso wie in Bereich 5. Hier zeigt das Cluster aus sechs Verbindungen drei Topoisomerase-Inhibitoren. Kasten 6 beinhaltet die DMSO-Kontrolle sowie die nächsten Nachbarn. Cruentaren A, Amanitin, Argyrin A und Colchicin waren also in der jeweils getesteten Konzentration nur wenig oder gar nicht wirksam oder die verwendeten Antikörper waren für die von den Proben hervorgerufenen Effekte nicht geeignet. In Abbildung 3-18 lassen sich noch mehr Beispiele für passende Cluster ablesen, es gab aber auch Beispiele, die die Erwartungen nicht erfüllten. Unter anderem waren zwar die p38-MAPKinase-Inhibitoren SB203580 und SB202190 zusammen (2. und 3. Reihe von oben), der dritte Vertreter dieser Inhibitorgruppe, PD169316, war hingegen nicht im selben Cluster gruppiert (über Markierung 4).

Die hier für A-498-Zellen dargestellten Ergebnisse stimmten größtenteils mit denen der HCA mit KB-3-1-Zellen überein (ohne Abbildung). Es ergaben sich zwar leicht abweichende Werte für die Ähnlichkeiten, es wurden aber vergleichbare Cluster gebildet. Z. B. waren die V-ATPase-Inhibitoren Apiculan und Archazolid B ebenfalls in einem Cluster zu finden, der PK lag hier bei 0,82. Ebenso waren die Histon-Deacetylase-Inhibitoren und die topoisomerasewirksamen Verbindungen jeweils zusammen gruppiert und Velcade zeigte auch bei den KB-3-1-Zellen die höchste Ähnlichkeit zu MG132 (PK 0,65). Der größte Unterschied in den beiden Ansätzen lag darin, dass noch mehr Verbindungen in dem oben mit 2 markierten Cluster auftauchten. Die KB-3-1 waren im Vergleich weniger adhärent, hier wurden die Zellen also noch leichter durch die von den Verbindungen hervorgerufenen Effekte abgelöst.

### 3.2.4 HCA der Naturstoffe

Für die Ermittlung der einzusetzenden Konzentrationen der Naturstoffe und Naturstoffderivate wurde wie für die Referenzverbindungen verfahren. Zunächst wurden die IC<sub>90</sub>-Werte bestimmt und die Konzentration gegebenenfalls verringert, wenn in Vor-

versuchen zu viele Zellen abgelöst waren. Die so bestimmten optimalen Konzentrationen sind in Tabelle 3-13 und Tabelle 3-14 aufgelistet.

**Tabelle 3-13: Tetransäuren für die HCA**

*Ermittelte optimale Konzentrationen im Test ( $\mu\text{M}$ )*

Name	Konzentration	Name	Konzentration
MelA	2,5	La(MelP)	6,0
Ca(MelA)	20	MelQ	17
La(MelA)	25	Mel„A/B“	26
Mg(MelA)	11	Mel„A/C“	13
Zn(MelA)	12	Rav369	37
MelC	11	Rav402	39
Ga(MelC)	19	Abu527	4,0
Ru(MelC)	4,0	Mac600-15	50
Ca(MelG)	1,5	Mac600-17	95
MelM	17	Mac600-22	40
(5S)-MelP	8		

**Tabelle 3-14: Naturstoffe für die HCA**

*Ermittelte optimale Konzentrationen im Test (nM)*

Name	Konzentration
Chivosazol A	4,0
Chivosazol F	29
S522	15
Prismatomerin	326
Plumericin	510
Isoplumericin	431

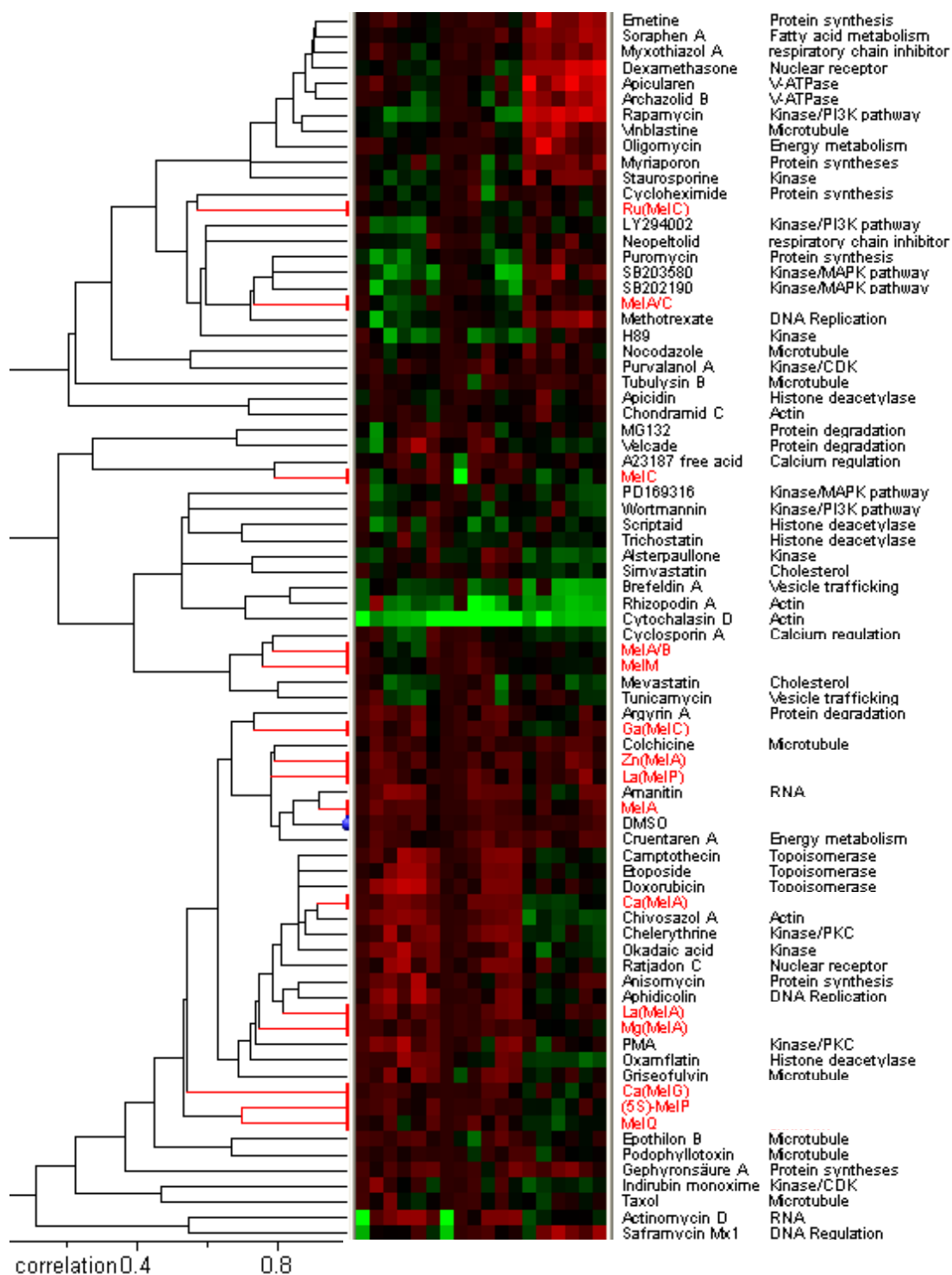
### 3.2.4.1 Tetransäuren

#### Melophline

Für die HCA standen nicht alle Melophline zur Verfügung. Von den Melophlinen B und R war nicht genug Substanzmenge vorhanden, um alle für diese Dissertation geplanten Arbeiten damit durchzuführen. Das Gleiche gilt für das nicht komplexierte Meloplin G, hier konnte aber stattdessen der Ca(MelG)-Komplex verwendet werden.



Für die Melophline ergaben sich in der HCA sehr heterogene Ergebnisse. Sie waren sowohl mit den KB-3-1- als auch mit A-498-Zellen größtenteils über das ganze Dendrogramm verteilt. In Abbildung 3-19 ist das Dendrogramm der Melophline mit allen Referenzsubstanzen dargestellt. Hier lassen sich die Cluster aus Abbildung 3-18 wiederfinden, so auch das DMSO-Cluster. Dieses beinhaltet nun zusätzlich noch das freie Melophrin A, Zn(MelA) und La(MelP). Hier wurden die Melophline vermutlich in zu geringer Konzentration eingesetzt. Sowohl La(MelA) als auch Mg(MelA) zeigten die höchsten Korrelationskoeffizienten mit Topoisomerase-Inhibitoren, La(MelA) mit Doxorubicin (PK 0,82) und Mg(MelA) mit Camptothecin (PK 0,86). Ca(MelA) war hingegen dem actinwirksamen Chivosazol A, sowie den beiden Kinase-Inhibitoren Chelerythrin und Okadainsäure am ähnlichsten. Bei den auf Melophrin C basierenden Verbindungen zeigte der Gallium-Komplex die größte Übereinstimmung mit DMSO. Melophrin C hingegen zeigte zu dem Ionen-Carrier A23187 eine Ähnlichkeit mit einem PK von 0,79 und wies ansonsten keine großen Ähnlichkeiten zu den Verbindungen des Referenzsatzes auf. Ähnlich verhielt es sich für Ru(MelC), das auch nur geringe Ähnlichkeit zu anderen Verbindungen zeigte, der nächste Nachbar war hier mit einem PK von 0,63 der Kinase-Inhibitor SB202190. In dem erweiterten Cluster von Ru(MelC) waren mehrere Kinase-Inhibitoren zu finden. Die Profile von Ca(MelG) und (5S)-Melophrin P zeigten die größten Übereinstimmung mit Ca(MelA) (PK 0,66 und 0,74). Es gab jedoch andere Verbindungen, die dem Profil von Ca(MelA) ähnlicher waren (s. o.). (5S)-Melophrin P und Melophrin Q bildeten ein Zweiercluster mit einem PK von 0,70. Melophrin M, Cyclosporin A (beeinflusst die Calcium-Regulation) und Melophrin „A/B“ bildeten zusammen ein Cluster mit Korrelationskoeffizienten von 0,71 bis 0,78. Bei den dem Melophrin „A/C“ ähnlichsten Verbindungen handelte es sich um mehrere Kinase-Inhibitoren.



**Abbildung 3-19: Hierarchische Clusteranalyse mit den Melophlinen**

Rote Markierungen: Melophline; verwendete Zelllinie: A-498; Pearsons Korrelationskoeffizient; Deskriptoren: % der Zellen, die positiv sind für die jeweilige Färbung (Spalten 1-12), Gesamtzellzahl (Spalten 13-18)

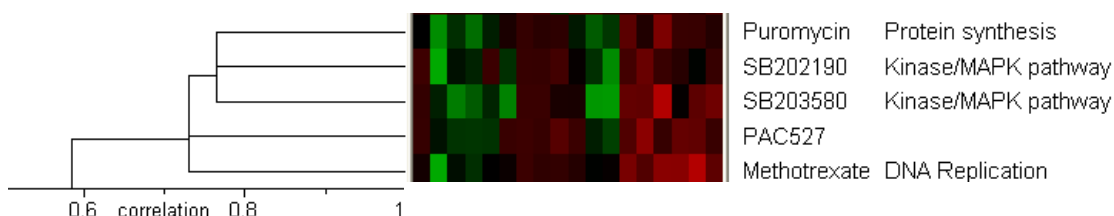
### Raveninsäure

Das Raveninsäure-Fragment Rav369 war in einem Cluster mit Brefeldin A, Rhizopodien A und Cytochalasin D zu finden (vgl. Abbildung 3-18, Markierung 2). Es wurde zu stark konzentriert eingesetzt, so dass nach der Inkubation nicht genug Zellen für die Analyse vorhanden waren.

Die Profile von Oxamflatin und Chivosazol A wiesen mit Korrelationskoeffizienten von 0,86 und 0,85 (Pearson) die größte Ähnlichkeit zu dem Profil der Raveninsäure Rav402 auf. Oxamflatin inhibiert die Histon-Deacetylase, war aber nicht in einem Cluster mit den anderen Verbindungen dieser Substanzklasse gruppiert. Chivosazol A inhibiert hingegen die Actin-Polymerisation. In der hierarchischen Clusteranalyse war Rav402 in einem sehr heterogenen Cluster zu finden.

### Aburatubolactam

Wie in Abbildung 3-20 dargestellt, war das Aburatubolactam-Fragment Abu527 (in der Abbildung PAC527) in einem hierarchischen Cluster mit den beiden p38-MAPKinase-Inhibitoren SB203580 und SB202190 gruppiert. In diesem Cluster befanden sich auch die beiden Verbindungen Puromycin und Methotrexat, Hemmer der Protein-Biosynthese bzw. der DNA-Synthese.



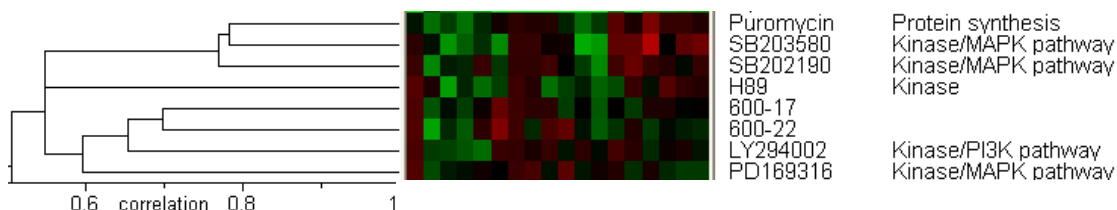
#### **Abbildung 3-20: Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse mit dem Aburatubolactam-Fragment**

*Abu527 entspricht hier PAC527; verwendete Zelllinie: A-498; Pearsons Korrelationskoeffizient; Deskriptoren: % der Zellen, die positiv sind für die jeweilige Färbung (Spalten 1-12), Gesamtzellzahl (Spalten 13-18)*

### Macrocidin

Die beiden Macrocidin-Fragmente Mac600-17 und Mac600-22 waren zusammen mit mehreren Kinase-Inhibitoren in einem Cluster, darunter drei MAP-Kinase-Inhibitoren. Mac600-15 war nicht in einem Cluster mit den anderen beiden Macrocidin-Fragmen-

ten zu finden. Es zeigte die höchste Korrelation (PK 0,79) jedoch ebenfalls mit einem Kinase-Inhibitor, und zwar mit Alsterpaullone, das cyclinabhängige Kinasen inhibiert.



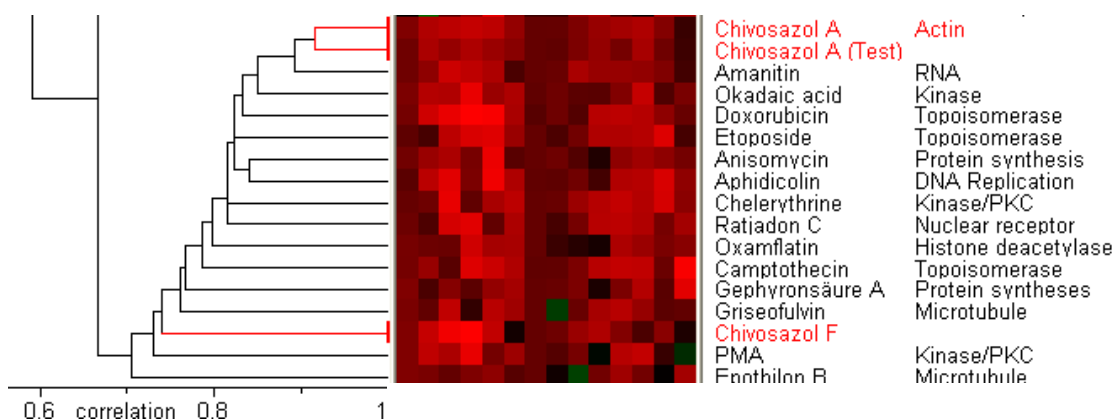
**Abbildung 3-21: Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse mit den Macrocyclin-Fragmenten**

Mac600-17 und Mac600-22 hier nur 600-17 und 600-22; verwendete Zelllinie: A-498; Pearsons Korrelationskoeffizient; Deskriptoren: % der Zellen, die positiv sind für die jeweilige Färbung (Spalten 1-12), Gesamtzellzahl (Spalten 13-18)

### 3.2.4.2 Chivosazole, S522

#### Chivosazole A und F

Von den Chivosazolen war bekannt, dass sie einen Abbau des Actincytoskeletts in der Zelle bewirken. Dies sollte in der HCA bestätigt werden. Chivosazol A lag hierbei deshalb sowohl als Referenzsubstanz als auch in Form einer „Blindprobe“ im Test vor. Die beiden Proben bildeten in der hierarchischen Clusteranalyse zusammen ein Cluster (ES 0,92).



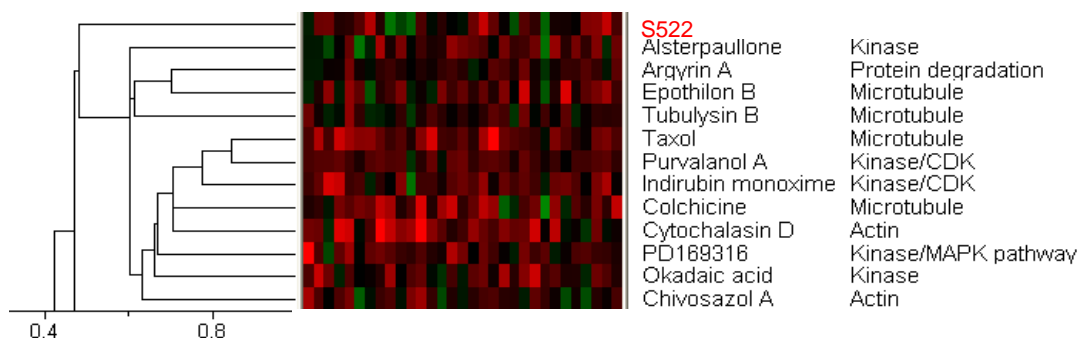
**Abbildung 3-22: Ausschnitt der zellbasierten hierarchischen Clusteranalyse mit den Chivosazolen A und F**

Verwendete Zelllinie: A-498; Quadrat des Euklidischen Abstands; Deskriptoren: % der Zellen, die positiv sind für die jeweilige Färbung (Spalten 1-12), Fläche des Zellkerns pro Zelle und Textur-Index (Spalten 13-14)

Das Profil von Chivosazol F ähnelte den Profilen von Chivosazol A und dem „unbekannten“ Test-Chivosazol A mit ES 0,79 und 0,77, lag aber in dem hierarchischen Cluster etwas weiter entfernt. Den höchsten ES von 0,85 wies Chivosazol F mit Amanitin (blockiert die mRNA-Synthese) auf. Wie in Abbildung 3-22 zu erkennen, war dies auch die den beiden anderen Chivosazolen ähnlichste Verbindung (ES 0,89 und 0,88). Keines der Chivosazole war in unmittelbarer Nähe zu einer anderen actin-wirksamen Substanz zu finden.

### S522

Abbildung 3-23 zeigt einen Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse der HCA-Substanzsammlung zusammen mit S522. Dieser Clusteranalyse liegt eine zellbasierte Auswertung zugrunde.



**Abbildung 3-23: Ausschnitt der zellbasierten hierarchischen Clusteranalyse mit S522**

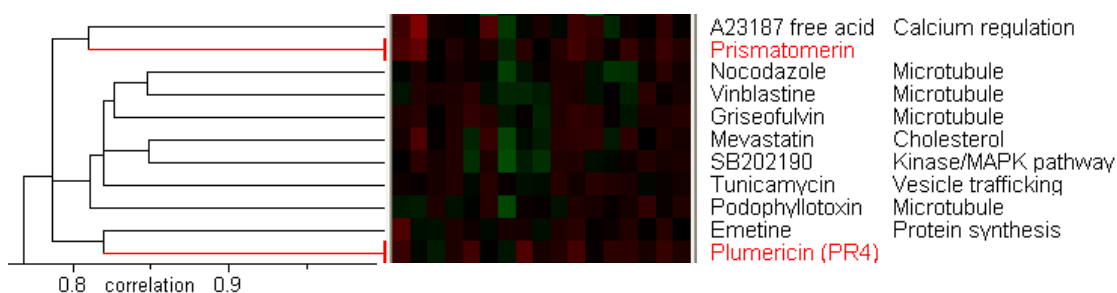
Verwendete Zelllinie: KB-3-1; Pearsons Korrelationskoeffizient; Deskriptoren: Textur-Index, durchschnittliche Vesikel-Intensität, gesamte Vesikel-Fläche (Spalten 1-3), durchschnittliche Intensität und gefärbte Fläche für alle Färbungen (Spalten 4-31)

Die dem Naturstoff S522 ähnlichsten Verbindungen waren Taxol (Stabilisierung der Mikrotubuli), Indirubin-3'-monoxim und Purvalanol A (beides Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen, CDK). Allerdings waren hier die Korrelationskoeffizienten mit 0,55 und 0,54 (für beide CDK-Inhibitoren gleich) relativ niedrig. In diesem erweiterten Cluster waren ebenfalls einige Verbindungen mit Effekt auf das Cytoskelett zu finden, sowohl auf die Actinfilamente als auch auf die Mikrotubuli.

#### **3.2.4.3 Prismatomerin, Plumericin, Isoplumericin**

Obwohl die drei Verbindungen strukturell große Ähnlichkeiten aufweisen, befanden sie sich in den hierarchischen Clusteranalysen nicht in direkter Nachbarschaft, wobei sich die Profile von Prismatomerin und Plumericin noch am ähnlichsten waren. Sie

waren mit ES 0,77 beim Test mit KB-3-1-Zellen in einem Cluster mit mehreren mikrotubuliwirksamen Verbindungen zu finden (Abbildung 3-24). Für Prismaticerin war ein Effekt auf die Bildung des Mikrotubuli-Spindelapparates publiziert [Krohn et al., 2007].



**Abbildung 3-24: Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse mit Prismaticerin und Plumericin**

Verwendete Zelllinie: KB-3-1; Quadrat des Euklidischen Abstands; Deskriptoren: Gesamtzellzahl (von zwei Platten) und durchschnittliche Intensität der Zellkernfärbung (Spalten 1-3), % der Zellen, die positiv sind für die jeweilige Färbung (Spalten 4-15), Vesikel-Fläche pro Zelle und durchschnittliche Vesikel-Intensität (Spalten 16-17)

Wie in Abbildung 3-25 zu erkennen, gruppierte sich Isoplumericin im Test mit A-498-Zellen zusammen mit dem actinwirksamen Chivosazol A (PK 0,97) und den drei Topoisomerase-Inhibitoren Doxorubicin, Etoposid und Camptothecin (PK 0,96, 0,96 und 0,94).



**Abbildung 3-25: Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse mit Isoplumericin**

Verwendete Zelllinie: A-498; Pearsons Korrelationskoeffizient; Deskriptoren: % der Zellen, die positiv sind für die jeweilige Färbung (Spalten 1-12)

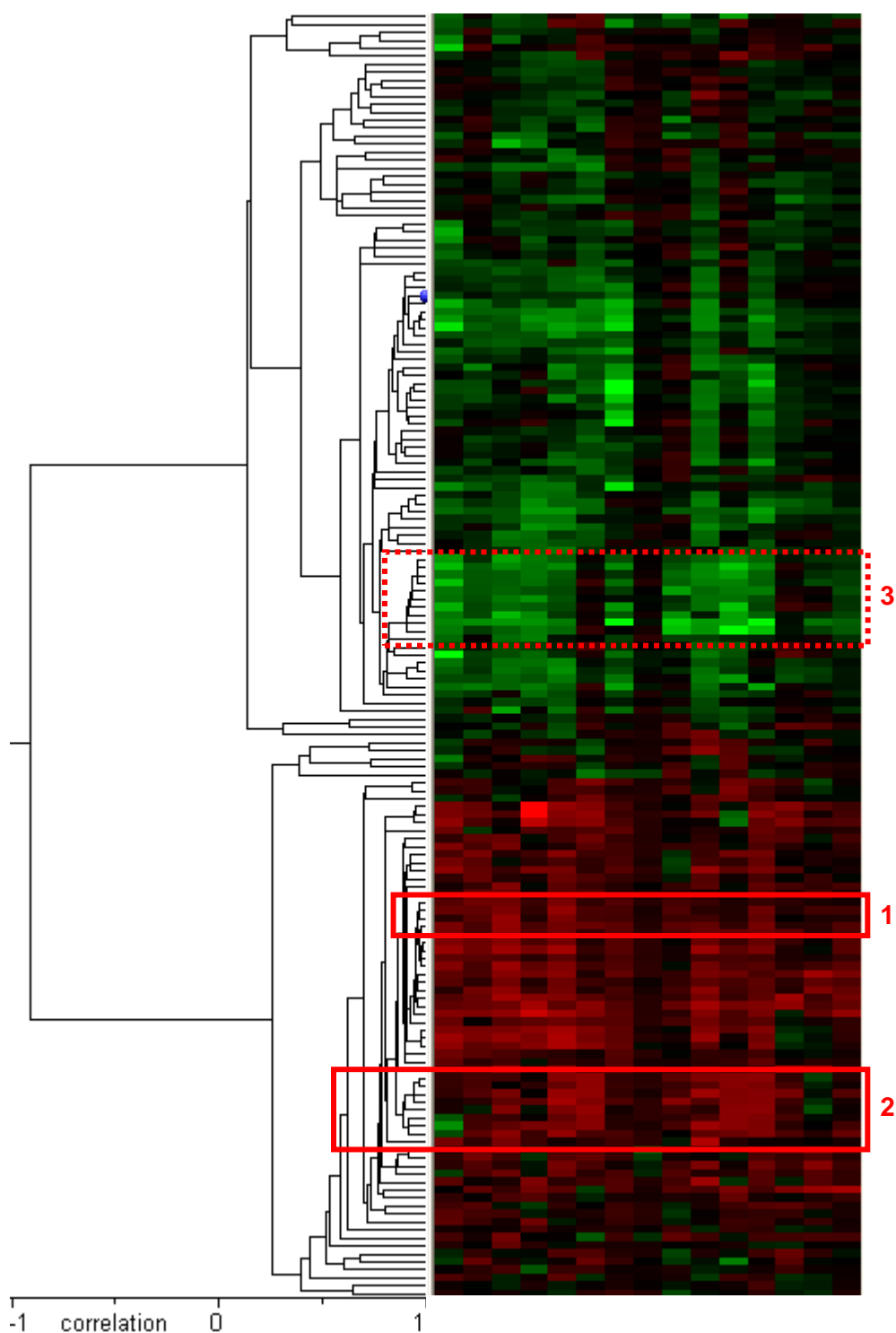
### 3.2.5 HCA der Myxobakterien-Substanzsammlung

Von einigen der insgesamt 154 Naturstoffe aus der Myxobakterien-Substanzsammlung war ein Wirkmechanismus vor Etablierung der HCA bekannt, häufig allerdings lediglich für die Hauptverbindungen der jeweiligen Klasse. Diese sind oft mit dem Zusatz „A“ im Namen gekennzeichnet, z. B. Soraphen A. In diesen Fällen wurde für verwandte Verbindungen, meist mit minimalen Strukturveränderungen, der gleiche

Wirkmechanismus angenommen, was allerdings oft nicht bestätigt war. Wie schon bei der HCA der Naturstoffe mithilfe der Referenzsubstanzen konnten auch bei der HCA der Myxobakterien-Sammlung die bekannten Verbindungen zum Vergleich herangezogen werden.

Alle Substanzen in der Myxobakterien-Substanzsammlung lagen in einer Konzentration von 1 mM vor. Die nach der 1000-fachen Verdünnung im Well vorliegende endgültige Konzentration von 1  $\mu$ M war bei einigen Substanzen zu hoch, so dass in den entsprechenden Wells nach der Inkubation keine oder nur vereinzelte Zellen zu finden waren. Diese Verbindungen wurden vor der Analyse aus dem Datensatz entfernt.

In Abbildung 3-26 ist eine hierarchische Clusteranalyse der Verbindungen aus der Myxobakterien-Substanzsammlung dargestellt.

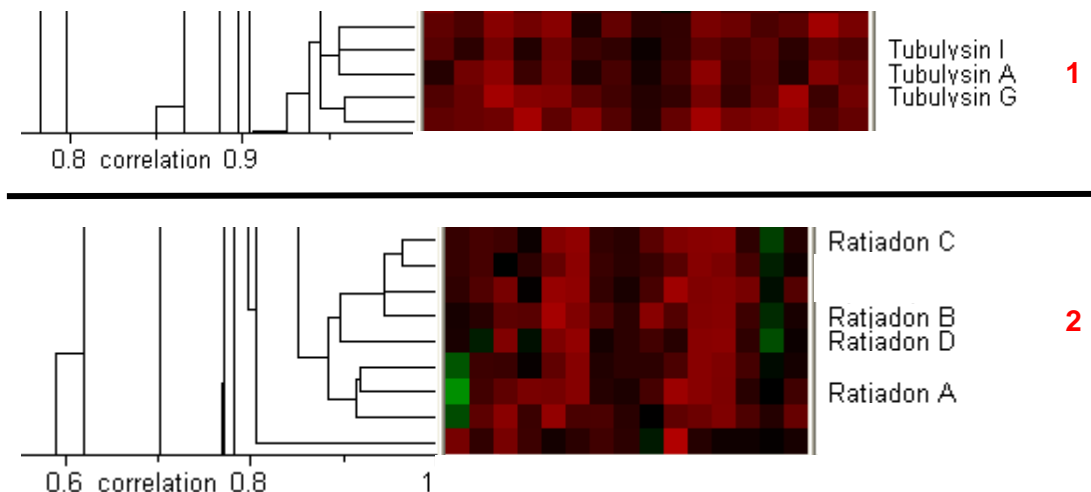


**Abbildung 3-26: Hierarchische Clusteranalyse der Naturstoffe der Myxobakterien-Substanzsammlung**

Verwendete Zelllinie: A-498; Pearsons Korrelationskoeffizient; Deskriptoren: % der Zellen, die positiv sind für die jeweilige Färbung (Spalten 1-12), Textur-Index, Vesikel-Fläche pro Zelle, durchschnittliche Vesikel-Intensität (Spalten 13-15); blauer Punkt: DMSO-Kontrolle



Es durften in dieser Dissertation nur ausgewählte Verbindungen namentlich erwähnt werden, da die Daten zu einigen der Verbindungen noch nicht publiziert waren. In den folgenden Dendrogrammen sind Ausschnitte der Clusteranalyse in Abbildung 3-26 dargestellt, die die Funktionalität der HCA zeigen.

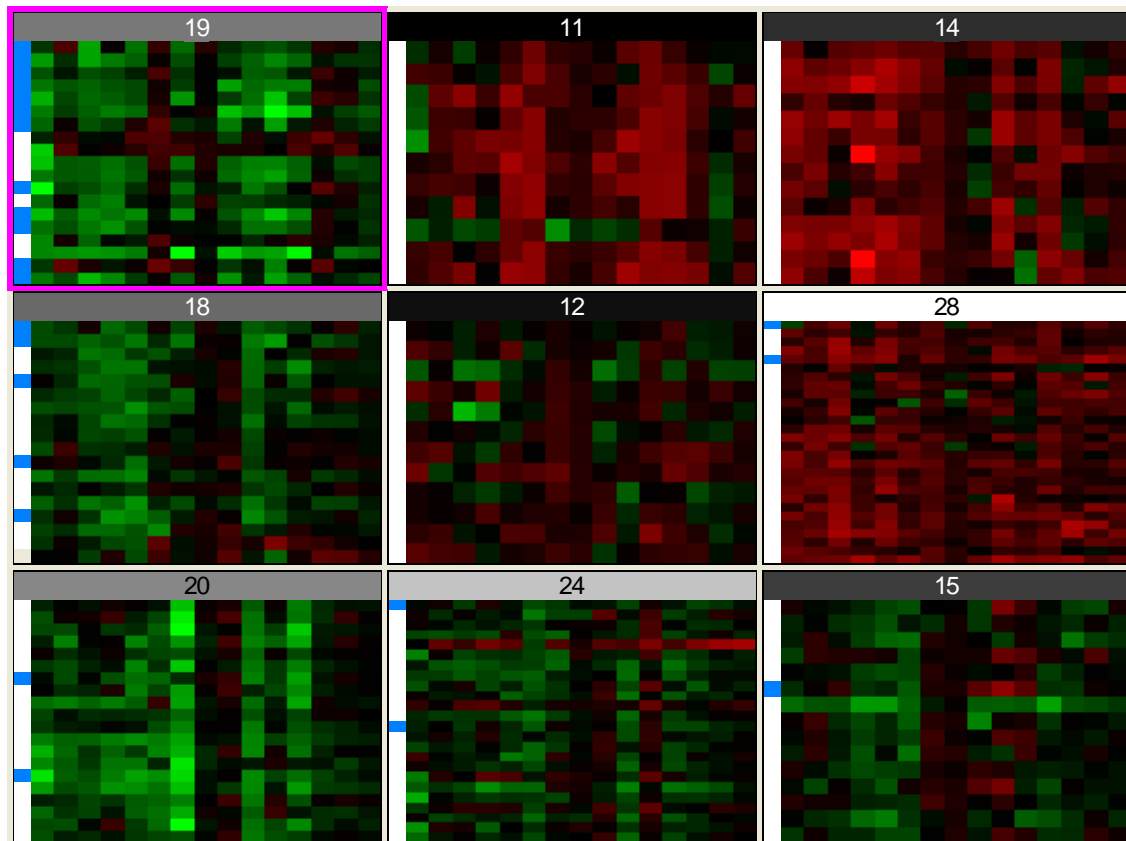


**Abbildung 3-27: Ausschnitte der hierarchischen Clusteranalyse in Abbildung 3-26**

Die Tubulysine A, G und I waren mit PK 0,90 bis 0,95 zusammen gruppiert (Ausschnitt 1). Tubulysin B war mit PK 0,88 (zu Tubulysin A) im Dendrogramm ebenfalls in räumlicher Nähe zu finden (nicht dargestellt).

Die Ratjadone A-D in Ausschnitt 2 befanden sich bei der hierarchischen Clusteranalyse nach Pearson in einer Gruppe, mit Korrelationskoeffizienten von 0,73 (Ratjaden A zu Ratjaden C) bis 0,95 (Ratjaden B zu Ratjaden C).

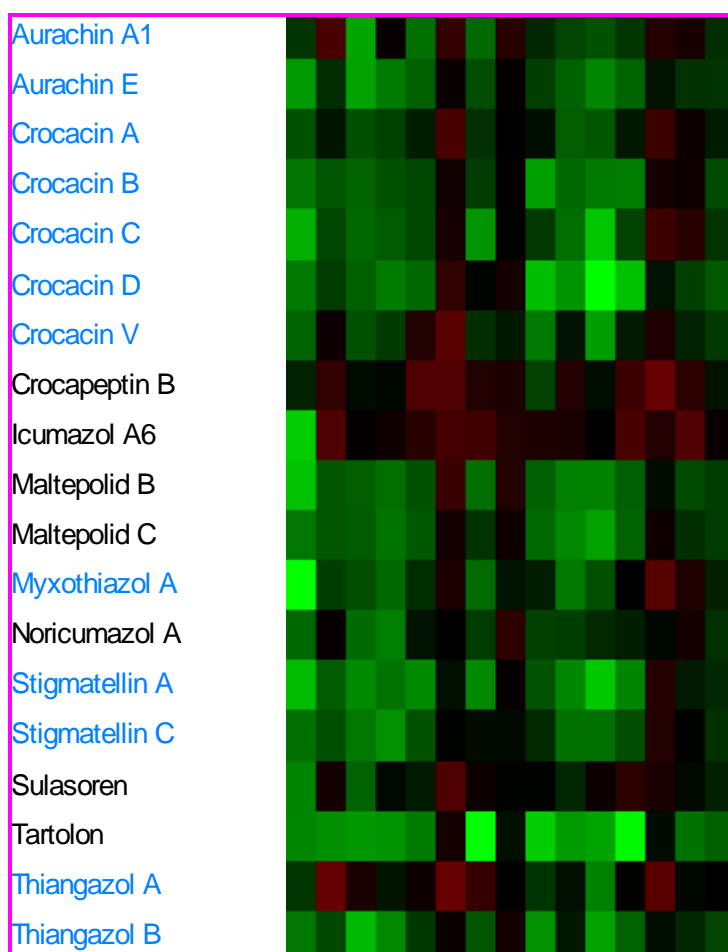
Abbildung 3-28 zeigt neun Gruppen einer bildbasierten SOM-Analyse der Myxobakterien-Substanzsammlung. Bei den blau markierten Reihen handelt es sich um Verbindungen, die den Elektronentransport in Zellen und somit einen essentiellen Teil des Energiestoffwechsels inhibieren.



**Abbildung 3-28: SOM-Analyse der Myxobakterien-Substanzsammlung**

Blau markierte Reihen: Inhibitoren des Elektronentransports; verwendete Zelllinie: A-498; Analyse: SOM, 3x3 Gruppen; Zahlenwerte: Anzahl der Verbindung in den Gruppen; Deskriptoren: % der Zellen, die positiv sind für die jeweilige Färbung (Spalten 1-12), zellulärer Textur-Index, Vesikel-Fläche pro Zelle und durchschnittliche Vesikel-Intensität (Spalten 13-15)

Eine Gruppe (in Abbildung 3-28 oben links) ist in Abbildung 3-29 vergrößert dargestellt. Die meisten Verbindungen dieser Gruppe waren in Abbildung 3-26 in dem markierten Bereich 3 zu finden.



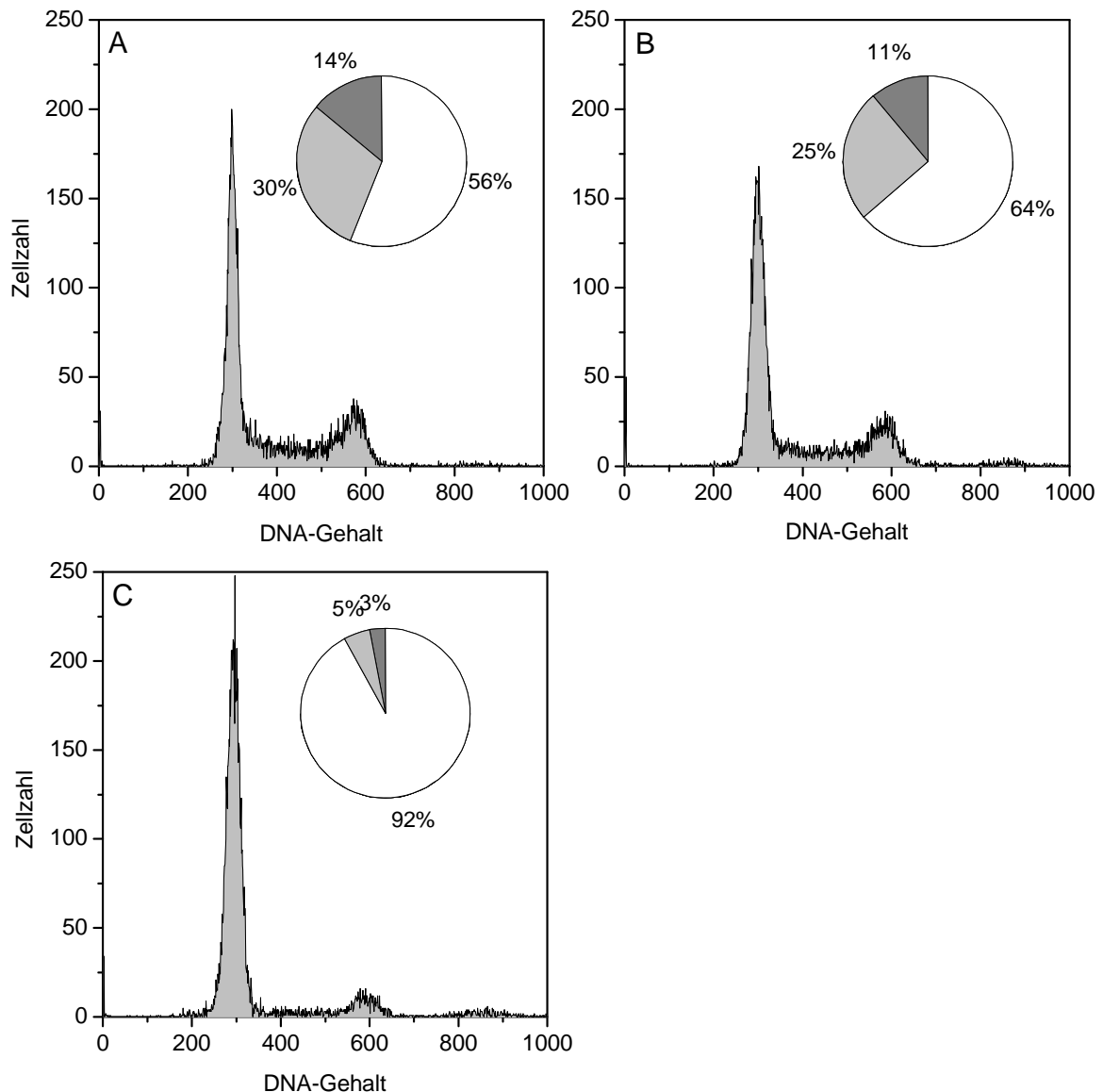
**Abbildung 3-29: Eine Gruppe der SOM-Analyse aus Abbildung 3-28**

*Blaue Schrift: Inhibitoren des Elektronentransports*

Der Großteil der in der Substanzsammlung vorhandenen Inhibitoren des Elektronentransports befand sich in dieser Gruppe, unter anderem alle getesteten Crocacine.

### 3.2.6 Weiterführende Versuche (auf HCA basierend)

Die High-Content Analyse sollte dabei helfen, die biologischen Wirkmechanismen unbekannter Verbindungen herauszufinden, indem Wirkprofile dieser Proben mit denen bekannter Substanzen verglichen werden. Im Fall der von Myxobakterien produzierten Verbindung S522 z. B. ergab die HCA, dass es sich bei zwei der drei dem Naturstoff S522 ähnlichsten Profile um die von Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen handelte, wie in Abschnitt 3.2.4.2 dargestellt. Nach diesen Ergebnissen konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass S522 ebenfalls ein CDK-Inhibitor ist. Cyclin-abhängige Kinasen spielen eine wichtige Rolle im Kontrollsystem des Zellzyklus, deshalb wurden Zellzyklusuntersuchungen mit S522 durchgeführt (Abbildung 3-30).



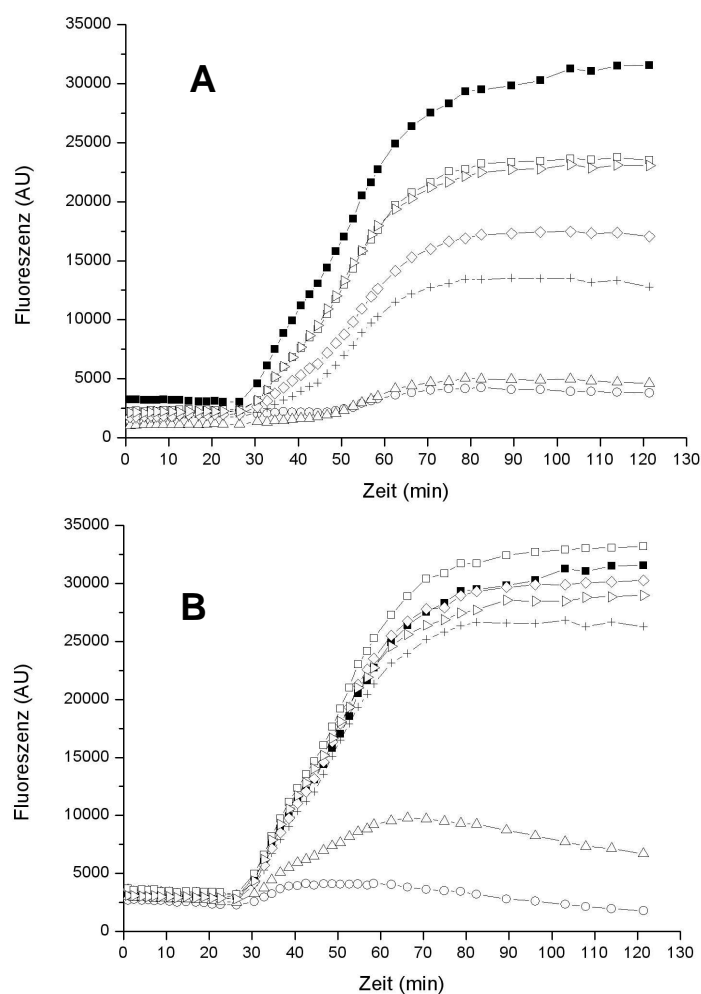
**Abbildung 3-30: Einfluss von S522 auf den Zellzyklus**

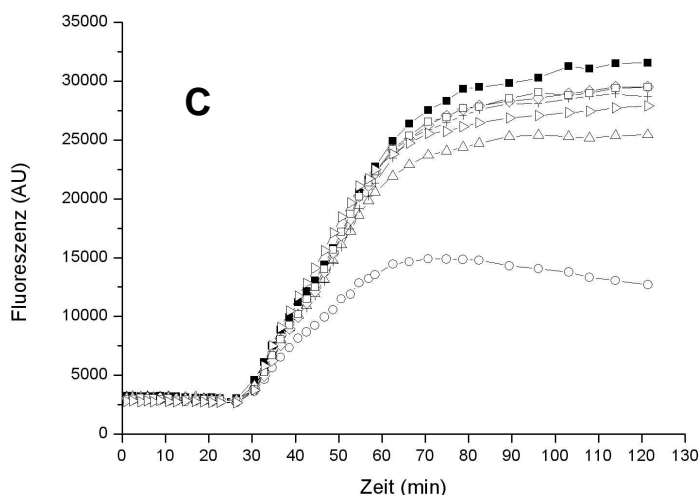
Zellzyklusuntersuchungen von L-929-Zellen mit MeOH (A) und 50 ng/ml S522 nach 1 d (B) und nach 2 d (C); Histogramme: einfacher DNA-Gehalt = G0/G1-Phase bei 300, doppelter DNA-Gehalt = G2/M-Phase bei 600, S-Phase dazwischen; Tortendiagramme: G0/G1-Phase: weiß, S-Phase: hellgrau, G2/M-Phase: dunkelgrau

Nach einer 2-tägigen Inkubation von L-929-Zellen mit S522 ließ sich ein Effekt auf den Zellzyklus daran feststellen, dass deutlich mehr Zellen in der G0/G1-Phase zu finden waren als in der Kontrolle. Dies bestätigte die aus der HCA abgeleitete Hypothese, dass S522 einen Einfluss auf den Zellzyklus hat.

In Abschnitt 3.1.3 sind die Ergebnisse der HCA von Prismaticin, Plumericin und Isoplumericin dargestellt, welche für die beiden erstgenannten Verbindungen auf

einen Effekt auf die Mikrotubuli hinwiesen. Ein direkter Einfluss auf die Polymerisation der Mikrotubuli *in vitro* konnte schon untersucht und bestätigt werden (persönliche Mitteilungen von Dr. F. Sasse), deshalb wurde dem nicht erneut nachgegangen. Die HCA von Isoplumericin ergab die größte Ähnlichkeit mit dem actinwirksamen Chivosazol A (PK 0,97). Dies legte die Vermutung nahe, dass Isoplumericin ebenfalls einen Effekt auf die Actinfilamente haben könnte. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten von Isoplumericin zu Plumericin und Prismatomerin wurden für alle drei Verbindungen Versuche zur Actin-Polymerisation *in vitro* durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-31 dargestellt.



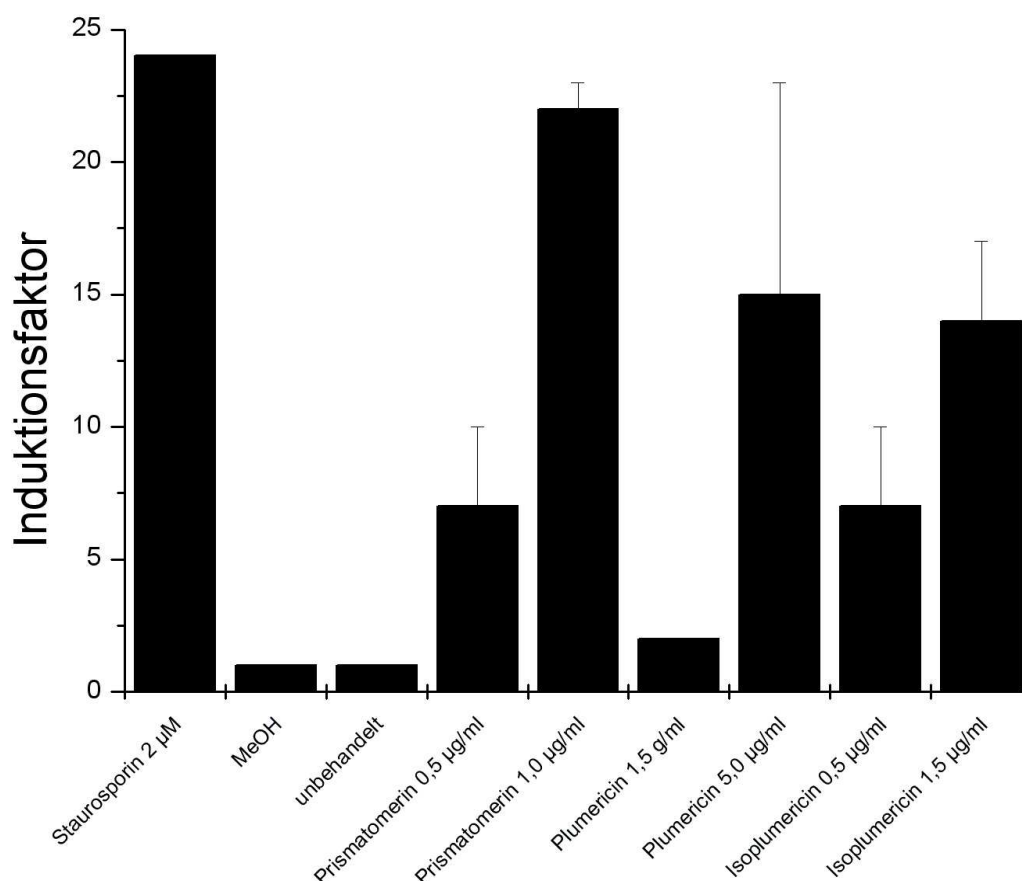


**Abbildung 3-31: Einfluss von Prismatomerin, Isoplumericin und Plumericin auf die Actin-Polymerisation**

Prismatomerin (A), Isoplumericin (B) und Plumericin (C); Zugabe des Polymerisations-Puffers nach 28 min;  $\square$  5  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\triangleright$  10  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\diamond$  20  $\mu\text{g/ml}$ ;  $+$  40  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\triangle$  80  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\circ$  160  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\blacksquare$  MeOH; entsprechende Molaritäten: Prismatomerin 14-435  $\mu\text{M}$ , Isoplumericin 17-551  $\mu\text{M}$ , Plumericin 10-326  $\mu\text{M}$

Alle drei Verbindungen inhibierten die Polymerisation des G-Actins *in vitro*, wobei Prismatomerin am wirksamsten war. Hier ließ sich mit 20  $\mu\text{g/ml}$  noch ein deutlicher Effekt feststellen, wohingegen bei Isoplumericin mit 40  $\mu\text{g/ml}$  und bei Plumericin mit 80  $\mu\text{g/ml}$  bereits kein Unterschied zur Kontrolle mehr zu verzeichnen war.

Die Analyse der HCA zeigte des Weiteren drei Topoisomerase-Inhibitoren in einem engeren Cluster mit Isoplumericin. Dies könnte auf eine topoisomeraseinhibierende Wirkung des Iridoids hinweisen. Für viele Verbindungen dieser Wirkungsgruppe ist ein induzierender Effekt auf die Apoptose beschrieben [z. B. Sordet et al., 2003]. Da Caspasen in der Apoptose eine wichtige Rolle spielen, kann die Überprüfung ihrer Aktivität als Hinweis für apoptoseinduzierende Wirkung von Verbindungen verwendet werden [Alberts et al., 2004]. Dies wurde für Prismatomerin, Plumericin und Isoplumericin durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-32 dargestellt.



**Abbildung 3-32: Induktion der Caspase-Aktivität**

*Inkubation von PtK2-Zellen mit den Proben für 20 h; Bestimmung des Induktionsfaktors („RLU der Probe“ dividiert durch „RLU der unbehandelten Zellen“)*

Staurosporin ist bekannt für seine apoptoseinduzierende Wirkung [Römpp, 2009], was auch hier gezeigt werden konnte. Weder nach der Behandlung der PtK2-Zellen nur mit dem Lösemittel (MeOH) noch bei unbehandelten Zellen war eine erhöhte Caspase-Aktivität festzustellen. Die Inkubation der Zellen mit den drei Testsubstanzen Pristimerin, Plumericin und Isoplumericin führte hingegen zu einer deutlichen Apoptoseinduktion, vor allem in den jeweils höheren Konzentrationen.

## 4 Diskussion und Ausblick

Die zentralen Anliegen dieser Arbeit waren die Etablierung einer High-Content Analyse sowie die biologische Charakterisierung einiger Naturstoffe, unter anderem mithilfe der HCA. Im Folgenden wird zunächst die Etablierung und Anwendbarkeit der HCA mit möglichen Variationen/Optimierungen diskutiert. Im Anschluss werden die Ergebnisse für die verschiedenen Naturstoffe methodenübergreifend erörtert und die Ergebnisse für die Myxobakterien-Substanzsammlung diskutiert. Abschließend wird ein allgemeiner und zusammenfassender Ausblick für die HCA gegeben.

### 4.1 Etablierung der High-Content Analyse

Ein Hauptziel dieser Dissertation war die Etablierung der High-Content Analyse mit dem vorhandenen System ImageXpress Micro und den sonstigen gegebenen Bedingungen. Wie in Kapitel 3 an verschiedenen Beispielen gezeigt wurde, konnte die HCA erfolgreich etabliert werden. Dafür mussten mehrere Schritte des Protokolls optimiert werden.

Die HCA basiert auf dem Vergleich der Phänotypen von **Zellen**, die mithilfe verschiedener **Antikörper/Farbstoffe** sichtbar gemacht werden sowie dem anschließenden Erstellen und Vergleichen der **Profile** von Proben mit unbekanntem Wirkmechanismus mit denen **bekannter Referenzverbindungen**. Die vier wichtigsten, fett hervorgehobenen, Parameter werden im Folgenden diskutiert.

#### 4.1.1 Die Zellen

Die HCA basiert auf Zellen, bzw. den von Proben hervorgerufenen verschiedenen Phänotypen von Zellen, daher spielten die Zelllinie und die Verteilung der Zellen in den Wells sowie ihre Adhärenz eine große Rolle. Von den vier getesteten Zelllinien erwiesen sich die Cervixkarzinom- und Nierenkrebszellen KB-3-1 und A-498 als geeigneter als die in Kolonien wachsenden A-549- und PtK2-Zellen. Allerdings wiesen auch die beiden für die HCA ausgewählten Zelllinien Nachteile auf. Die A-498-Zellen wuchsen sehr langsam. Für einen Ansatz (sechs MTP-384 mit jeweils  $\sim 6,5 \times 10^5$  Zellen  $\rightarrow \sim 3,8 \times 10^6$  Zellen) wurden mehrere große Zellkulturflaschen ( $75 \text{ cm}^2$ ) benötigt, die alle angesetzt und trypsiniert werden mussten. Das verlangsamte den Arbeitsprozess. Der Nachteil der KB-3-1-Zellen lag in der geringeren Adhärenz, was auch einen stärker ausgeprägten Randeffect mit sich führte. Die Adhärenz konnte durch eine Optimierung der Fixierung verbessert werden. Die großen relativen Standardabweichungen in dem zugehörigen Versuchsansatz sind darauf zurückzuführen, dass mit 10X-Objektiv gearbeitet wurde und neun Bilder pro Well



gemacht wurden, um das komplette Well aufnehmen zu können. Diese deckten dann nur eine geringere Fläche ab und die Unterschiede zwischen Bildern in der Mitte des Wells und denen am Rand waren größer als wenn nur vier Bilder mit dem 4X-Objektiv aufgenommen wurden, die dann jeweils ein Viertel des Wells abdeckten, inklusive Rand- und Mittelbereich.

Die schlechte Verteilung, die durch den erwähnten Randeffekt zu erklären ist, konnte deutlich reduziert werden, es gab allerdings immer noch Schwankungen in den verschiedenen Ansätzen. Hier stellt der Vergleich verschiedener Mikrotiterplatten eine Möglichkeit zur Verbesserung dar. Bei den Untersuchungen zum Randeffekt fielen die generell hohen Standardabweichungen auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es zusätzlich zu dem bereits erwähnten Randeffekt auch einen Well-bezogenen Randeffekt gibt, d. h. am Rand des Wells sind mehr Zellen zu finden als in der Mitte. Eine Erklärung könnte der hier höhere Medienstand sein, der sich aufgrund der Oberflächenspannung einstellt. Dieser Randeffekt ist aber bei der HCA vernachlässigbar, da die Positionen zur Aufnahme der Bilder in jedem Ansatz manuell, je nach Verteilung der Zellen, angepasst werden können: bei vielen Zellen und hohem Randeffekt zentraler im Well, bei weniger Zellen oder einem geringeren Randeffekt eher im äußeren Bereich des Wells. Die Verwendung der KB-3-1-Zellen konnte also soweit optimiert werden, dass auch mit dieser Zelllinie gute Ergebnisse erzielt werden konnten. In Zukunft wäre es allerdings durchaus sinnvoll, weitere Zelllinien auf ihre Eignung für die HCA zu untersuchen, um auch die verbleibenden Mängel der momentan verwendeten Zelllinien zu vermeiden.

#### **4.1.2 Die Antikörper/Farbstoffe**

Es sind zahlreiche Antikörper/Farbstoffe kommerziell erhältlich, die für Fluoreszenzfärbungen eingesetzt werden könnten. Für diese HCA wurde versucht, ein breites Spektrum an Bindungspartnern abzudecken, wie beispielsweise Teile des Cytoskeletts, verschiedene Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Im Hinblick auf eine möglichst hohe Effizienz und leichte Durchführbarkeit der HCA aber auch auf möglichst niedrige Kosten wurden verschiedene Parameter der Färbungen optimiert. Für alle Antikörper/Farbstoffe erwiesen sich Inkubationszeiten von 1 h oder eine Inkubation über Nacht als sinnvoll; mit Ausnahme von DAPI, hier reichten 10 min aus. Bei den optimalen Konzentrationen gab es deutlich mehr Varianz und auch z. T. große Abweichungen von den Herstellerangaben. Fast alle Antikörper konnten in deutlich höheren Verdünnungen eingesetzt werden als von den Herstellern angegeben, ohne eine verringerte Signalstärke. Dies senkt die Kosten deutlich, da die

Antikörper/Farbstoffe neben den Mikrotiterplatten den ausschlaggebenden Kostenfaktor darstellen. Die Antikörper wurden in passende Sets zusammengefasst, so dass sechs Platten für einen HCA-Ansatz benötigt wurden. Die Verwendung von mehreren Färbungen in einer Platte spart sowohl Geld als auch Arbeits- und Akquisezeit.

Die Variabilität der HCA ist bei der Auswahl der Antikörper sehr hoch. Die hier verwendeten Antikörper erwiesen sich zwar als sinnvoll, könnten aber, nach der Durchführung einiger Vortests, leicht ausgetauscht werden. Die Auswahl der Antikörper könnte auch den Verbindungen angepasst werden. Soll z. B. ein Satz an Verbindungen getestet werden, von dem Effekte auf Kinasen bekannt sind, genauere Informationen aber fehlen, so könnten mehr Antikörper verwendet werden, die an verschiedene (phosphorylierte) Kinasen binden. Dadurch kann das Spektrum verkleinert aber präzisiert werden.

### **4.1.3 Die Referenzverbindungen**

Wie bei den Antikörpern wurde auch bei den Referenzverbindungen versucht, ein möglichst breites Spektrum an Aktivitäten abzudecken, denn nur diese Wirkmechanismen stehen als Vergleich für die neuen Proben zur Verfügung. Viele der Referenzverbindungen haben nicht nur ein Target, sondern mehrere Wirkmechanismen, für einige sind auch bereits verschiedene bekannt. Im Ergebnisteil sind bei den Darstellungen lediglich die Wirkmechanismen aufgelistet, die tatsächlich bekannt oder – bei mehreren bekannten – am stärksten ausgeprägt sind (detailliertere Beschreibungen in Tabelle 2-6). Aus ursprünglich über 90 geplanten Verbindungen wurden 62 wirksame ausgewählt und zunächst in der  $IC_{90}$  eingesetzt. Diese Konzentration musste für einige Substanzen aufgrund zu hoher Toxizität verringert werden, damit in allen Fällen genug Zellen für die Analyse der HCA zur Verfügung standen. Allerdings traten hierbei auch Schwankungen auf, so dass die eingesetzte Konzentration mal angemessen, mal zu hoch war. Dies ist vermutlich auf die Zugabe der Verbindungen mit dem Pintool zurückzuführen, da hier minimale Unterschiede in der Adhäsion der Lösungen an den Pins große Auswirkungen haben können. Die automatische Zugabe der Proben war aber trotzdem noch genauer als die manuelle. Bezüglich der Konzentration stellte sich zu Beginn der Arbeiten die grundsätzliche Frage, ob die Proben jeweils nur in einer Konzentration oder als Konzentrationsreihe eingesetzt werden sollten. In der Publikation von Perlman et al. [2004] wurden die Verbindungen in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Obwohl dieser Ansatz einige Vorteile mit sich bringt, verursacht er jedoch auch deutlich mehr Arbeitsaufwand und Kosten,

außerdem gibt es große Unterschiede zwischen der Analyse einer konzentrationsabhängigen HCA und einer „einfach-konzentrierten“ HCA. In dieser Dissertation sollte das Grundprinzip der HCA etabliert werden, deshalb wurde die Entscheidung zu Gunsten einer leichteren Durchführbarkeit und somit nur einzelner Konzentrationen getroffen. Dass selbst dieser minimierte Ansatz bereits sinnvolle Ergebnisse erbringen kann, wurde bereits demonstriert.

Um noch genauere Aussagen über die Wirkmechanismen der Verbindungen treffen zu können, sollte in Zukunft jedoch auch eine HCA etabliert werden, bei der Konzentrationsreihen der Verbindungen getestet werden. Chemische Verbindungen können mehrere Targets aufweisen, an die sie mit unterschiedlicher Affinität binden. Es wird vermutet, dass mit steigender Konzentration auch die Anzahl potentieller Bindungspartner zunimmt; es handelt sich dann allerdings um eher unspezifische Bindungen. Es ist auch möglich, dass in manchen Fällen erst das Zusammenspiel mehrerer, durch die Bindungen der Substanzen ausgelöster zellulärer Effekte den Wirkmechanismus ausmacht [Perlman et al., 2004; Mitchison, 2005]. Eine Möglichkeit konzentrationsabhängige Effekte vergleichend darzustellen, bietet der von Perlman et al. [2004] verwendete „TISS“ (Titration Invariant Similarity Score). Dafür wird für jede Verbindung ein Profil erstellt, das auch die Effekte bei den verschiedenen Konzentrationen beinhaltet. Alle Profile der Verbindungen eines Testansatzes werden dann paarweise miteinander verglichen, und für jedes Paar, unabhängig von der Konzentration, wird die größte Übereinstimmung gesucht. Diese Übereinstimmung wird dann für eine Clusteranalyse verwendet.

#### **4.1.4 Erstellen und Vergleichen der Profile: Die Analyse**

Die Analyse der HCA kann in zwei Schritte unterteilt werden. Zunächst müssen die Bilder segmentiert und die zugehörigen Werte generiert werden. Im zweiten Teil werden diese Zahlen in Profile der Verbindungen umgewandelt und mit verschiedenen Methoden analysiert. Der erste Auswertungsschritt besteht lediglich darin, bei MetaXpress die passenden Einstellungen für die Erkennung der Objekte zu bestimmen, daher wird dieser Schritt erst bei der Diskussion der Hochdurchsatzfähigkeit in Abschnitt 4.4 erneut aufgegriffen. Die Erstellung und der Vergleich der Profile mit AcuityXpress hingegen werden an dieser Stelle diskutiert.

AcuityXpress bietet viele Analyse-Möglichkeiten, basierend auf zahlreichen statistischen Methoden. Abhängig vom Versuchsansatz können die Methoden also variieren. Für die in dieser Arbeit etablierte HCA haben sich die hierarchische Clusteranalyse und die „Self-organizing maps“ mit den dazugehörigen Ähnlichkeitswerten als

am besten geeignet ergeben. Es sollte aber nicht nur stur eine Analysemethode basierend auf dem gleichen Ähnlichkeitsmaß verwendet werden, sondern vergleichend vorgegangen werden, um möglichst optimale Resultate zu erzielen.

Außerdem gibt es die Möglichkeit, bildbasierte oder zellbasierte Daten für die Analyse zu verwenden. Der größte Unterschied liegt darin, dass bei der zellbasierten Analyse mehr Deskriptoren zur Verfügung stehen, z. B. gefärbte Fläche pro Zelle. Je mehr Deskriptoren jedoch in einem Datensatz verwendet werden, desto geringer werden die Übereinstimmungen der Substanzprofile. Die zellbasierte Auswertung eignet sich eher für größere Datensätze, wie Screenings von Substanzbanken mit mehreren 1000 Verbindungen. Daher wurden für diese Arbeit fast ausschließlich bildbasierte Daten verwendet, die Anzahl an Deskriptoren reichte aus, wie bereits gezeigt wurde. Langfristig wäre aber auch die Bestimmung anderer bzw. zusätzlicher Deskriptoren sinnvoll. Es gibt bei MetaXpress z. B. die Möglichkeit, mithilfe der „Integrierten Morphometrie-Analyse“ weitere morphologische Parameter wie den Form-Faktor (aus Fläche und Umfang berechnet) und die Elliptizität (aus Länge und Breite) zu bestimmen.

## **4.2 Biologische Wirkmechanismen der Naturstoffe**

### **4.2.1 Allgemeines zu den Standardtests**

Die Tests mit einer breiten Palette an Mikroorganismen und mit verschiedenen Zelllinien erlauben generelle Aussagen über die Effektivität der Verbindungen. Zusätzliche Proliferationstests mit primären Zellen geben Auskunft darüber, ob eine antiproliferative Wirkung spezifisch gegen Krebszellen gerichtet ist; dies wäre für potentielle Antikrebsmittel sehr wünschenswert.

Die Effluxpumpe P-Glycoprotein, auch MDR-Protein genannt („multidrug resistance“), ist ein ABC-Transporter, welcher die Energie aus der Hydrolyse von ATP nutzt, um verschiedene Moleküle durch die Zellmembran zu befördern. In Krebszellen sind diese Proteine oft überexprimiert, was dazu führt, dass auch chemisch nicht verwandte Chemotherapeutika vermehrt aus der Zelle gepumpt werden und ihre Giftigkeit damit verringert wird. Diese Vielfach-Unempfindlichkeit stellt eine der größten Hürden im Kampf gegen Krebs dar [Alberts et al., 2004]. Für potentielle Antikrebsmittel ist also die Bestimmung der Affinität der Verbindungen zum MDR-Protein insofern von Bedeutung, als eine erhöhte Affinität die Chance auf einen Einsatz der Substanz in der Chemotherapie deutlich verringern würde.

### 4.2.2 Tetransäuren

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Tetransäuren handelte es sich um verschiedene freie und komplexierte Melophline, Raveninsäure und ein Raveninsäure-Fragment sowie Fragmente der macrocyclischen Naturstoffe Aburatubolactam und Macrocidin. Alle diese Verbindungen waren biologisch aktiv. Allerdings waren die nur in wenigen Fällen auftretenden antimikrobiellen Effekte klein und die antiproliferative Wirkung auf die Säugerzellen war ebenfalls relativ niedrig, vor allem im Vergleich mit dem Antikrebsmittel Epothilon. Letzteres war ca. 1000-fach wirksamer.

Für alle getesteten Tetransäuren brachten die Tests mit den primären Zelllinien sowie die Untersuchungen zur Affinität der Verbindungen zum P-Glycoprotein keine besonders auffälligen Ergebnisse. Auf der einen Seite wäre eine erhöhte antiproliferative Aktivität gegen primäre Zellen von Vorteil gewesen, diese trat allerdings nicht auf. Die Tetransäuren wurden aber auch nicht vermehrt aus der Zelle herausgepumpt.

Es könnte auch vermutet werden, dass die Tetransäuren die Membranen der Zellen zerstören und so eine cytotoxische Wirkung besitzen. Dagegen sprechen aber unter anderem die phänotypischen Untersuchungen der Melophline A und G (rufen intrazelluläre Veränderungen hervor), die Befunde von Knoth et al. [2009] (Melophrin A inhibiert Dynamin) sowie die Zellzyklusuntersuchungen. Für diese Vorgänge werden intrazelluläre Effekte benötigt, die entweder durch die Verbindungen selbst entstehen oder durch Signale, welche die Verbindungen an extrazellulären Rezeptoren auslösen.

#### 4.2.2.1 Melophline

Bei den Proliferationstests der Melophline fiel auf, dass die komplexierten Verbindungen wirksamer waren, wenn man die Werte wie in Tabelle 3-4 auf molarer Basis vergleicht. Dies lässt vermuten, dass die Komplexe von vornherein – oder zumindest in den Zellen – nicht mehr als solche vorlagen. Die  $IC_{50}$ -Werte waren bei den Komplexen mit zwei- und dreiwertigen Ionen häufig auch um ein Zwei- bis Dreifaches niedriger als bei den freien Verbindungen. Das spricht dafür, dass mehr freie Melophline zur Verfügung standen. Auf der anderen Seite sind Metall-Komplexe mit verschiedenen Substanzen in der Krebstherapie für ihre erhöhte biologische Wirksamkeit bekannt [Hambley, 2007; Bruijninx & Sadler, 2007], vor allem Ruthenium-Verbindungen [Ang & Dyson, 2006]. Dies würde die erhöhte Wirksamkeit von Ru(MelC) gegenüber dem reinen Melophrin C erklären, obwohl bei beiden nur ein Melophrin pro Molekül vorliegt. Auch in den anderen Fällen könnte die erhöhte Effektivität der

Melophlin-Metall-Komplexe auf einer synergistischen Verstärkung beruhen, z. B. durch einen erleichterten Transmembran-Transport.

Die Zellzyklusuntersuchungen deuteten auf einen höheren Anteil an S-Phase-Zellen nach der Behandlung mit den Melophlinen hin. Diese Phase definiert sich hauptsächlich dadurch, dass hier die DNA verdoppelt wird, deshalb könnte das ein Hinweis auf einen potentiellen Angriffspunkt der Melophline sein. Ein Arrest in der S-Phase widerspricht allerdings den Ergebnissen von Aoki et al. [2000], die nach der Behandlung von Mausfibroblasten mit den Melophlinen A und B von einem G1-Arrest berichten.

Bei den Fluoreszenzfärbungen sind die freien Melophline A und G sowie ihre Metall-Komplexe aufgefallen. Hier waren sie die einzigen Melophline, bei denen Veränderungen der Actinfilament-Strukturen in den Zellen zu beobachten waren. Dass dies aber kein direkter Effekt war, konnte *in vitro* mit Actin-Polymerisationstests gezeigt werden. Bei den mikrobiellen Tests zeigten die Melophline A und G erneut Ähnlichkeiten. Sie waren die einzigen der Melophline, bei denen keine Wirkung festgestellt werden konnte. In den eher heterogenen Ergebnissen der HCA waren sich verschiedene Komplexe von Melophlin A, sowie Ca(MelG) und (5S)-Melophlin P noch am ähnlichsten. Alle diese Verbindungen haben eine unverzweigte Seitenkette gemeinsam, A und P mit 16, G mit 14 Kohlenstoff-Atomen. Die Melophline A und G besitzen außerdem beide keine Methylgruppe am C5. Diese strukturellen Eigenschaften, unverzweigte Seitenkette und fehlende Methylgruppe an der Teträmsäure-einheit, könnten also für den Wirkmechanismus wichtige Parameter darstellen. Melophlin C wies weder in der HCA noch in den anderen Tests besondere Ähnlichkeiten zu den drei anderen genannten Melophlinen auf, besitzt jedoch auch eine unverzweigte Seitenkette. Diese ist mit nur 12 Kohlenstoffatomen jedoch kürzer, die Länge scheint also ebenfalls eine Rolle zu spielen. Auch die „neuen“ Melophline „A/B“ und „A/C“ haben keine Methylgruppe an der Teträmsäure, zeigten allerdings nicht die bei Melophlin A und G beobachteten Effekte auf die Actinfilamente. Vermutlich sind also sowohl die Teträmsäureeinheit als auch die Seitenkette für den Wirkmechanismus der Melophline entscheidend.

Einige Aussagen lassen sich anhand der HCA-Ergebnisse machen, z. B. könnte eine topoisomeraseinhibierende Wirkung für Melophlin A postuliert werden, da sowohl La(MelA) als auch Mg(MelA) mit Verbindungen dieser Wirkungsgruppe die größten Übereinstimmungen aufwiesen. In mehreren Fällen wurden auch Ähnlichkeiten zu Kinase-Inhibitoren gefunden. Diese Wirkung ist für mehrere Teträmsäuren bekannt

[Schobert, 2007]. Eine Erklärung für die ansonsten eher heterogenen Ergebnisse der Melophline in der HCA könnte der geringe Unterschied zwischen stark toxischen und unwirksamen Konzentrationen sein, was sich auch an sehr steilen Kurven bei den Proliferationstests erkennen ließ (nicht dargestellt). Hier wären konzentrationsabhängige Untersuchungen sinnvoll.

Anhand dieser insgesamt wenig uniformen Ergebnisse lassen sich kaum Hypothesen zum Wirkmechanismus der Melophline aufstellen. Es gibt aber, zusätzlich zu den hier festgestellten Effekten, weitere Ansätze, denen detaillierter nachgegangen werden kann. Die Melophline A und B können den Phänotypen Ras-transformierter MCDK-Zellen revertieren [Aoki et al., 2000; Knoth et al., 2009]. Diese Wirkung spielt für den potentiellen Einsatz der Verbindungen in der Krebstherapie eine wichtige Rolle. Für Meloplin A wurde auch ein Einfluss auf Dynamin beobachtet [Knoth et al., 2009]. Diesen Effekten sollte auch für die anderen Melophline und für die Metall-Komplexe nachgegangen werden. Nützlich wären außerdem fluoreszenzmarkierte Melophline, um die intrazelluläre Lokalisation der Verbindungen zu verfolgen.

#### **4.2.2.2 Raveninsäure**

Das Raveninsäure-Derivat Rav369, welches starke strukturelle Ähnlichkeiten zu den Meloplinen aufweist, war in fast allen Tests wirksamer als die Raveninsäure Rav402. Die antibiotische Aktivität unter anderem gegen *S. aureus* stimmt mit früheren Ergebnissen von Michael et al. [2002] überein.

Die High-Content Analyse ergab lediglich für die Raveninsäure Ergebnisse, da das Derivat Rav369 zu hoch konzentriert eingesetzt wurde. Wie schon bei den Meloplinen kann auch bei der Raveninsäure keine konkrete Hypothese zum Wirkmechanismus aufgestellt werden, was vermutlich ebenfalls auf den geringen Unterschied zwischen toxischer und nichtwirksamer Konzentration zurückzuführen ist. Die größten Ähnlichkeiten zeigte das Profil der Raveninsäure mit denen der Inhibitoren der Histon-Deacetylase und der Actin-Polymerisation. Ein weiterer Test könnte daher z. B. ein *in vitro* Actin-Polymerisationsassay sein.

#### **4.2.2.3 Aburatubolactam- und Macrocidin-Fragmente**

Um Aussagen über den Wirkmechanismus der macrocyclischen Verbindungen Aburatubolactam und Macrocidin treffen zu können, reichen Untersuchungen mit den vorliegenden Fragmenten nicht aus. Sie können jedoch Hinweise geben, denen dann bei vollendeter Synthese der Naturstoffe genauer nachgegangen werden kann. Tetramsäuren sind oft Inhibitoren von Kinasen und Phosphatasen; dies stimmt mit

den Ergebnissen der High-Content Analyse überein. Sowohl Abu527 als auch die Macrocidin-Fragmente waren in Gruppen mit mehreren Kinase-Inhibitoren zu finden, vor allem MAP-Kinase-Inhibitoren. Bei der Untersuchung dieser Fragmente bestand das gleiche Problem wie bei den anderen untersuchten Tetramsäuren: der schnelle Übergang von stark wirksamer zu unwirksamer Konzentration.

### 4.2.3 Chivosazole A und F

Die Chivosazole, von Myxobakterien produzierte Naturstoffe, zeigten eine ähnlich hohe antiproliferative Wirkung wie z. B. Epothilon, das ebenfalls aus Myxobakterien stammt. Sowohl Epothilon als auch die Chivosazole hemmten die Proliferation von Säugerzellen im ein- bis zweistelligen nanomolaren Bereich. Mehrere Versuche zeigten den Effekt der Chivosazole auf das Actin-Cytoskelett. Bei den Fluoreszenzfärbungen konnte bereits nach 15 min ein beginnender Abbau der Actinfilamente beobachtet werden. Nach einer eintägigen Behandlung von Zellen mit den Chivosazolen traten doppelkernige Zellen auf. Die Polymerisationstests mit pyrenmarkiertem G-Actin bestätigten einen Actin-Effekt auch im zellfreien System. Zellzyklusuntersuchungen ergaben eine deutliche Verzögerung in der G2/M-Phase. Actin bildet unter anderem einen wichtigen Teil des kontraktilen Rings. Dieser ist für die Cytokinese von großer Bedeutung, ohne ihn können die Tochterzellen nicht voneinander getrennt werden [Alberts et al., 2004]. Die Inhibierung der Actin-Polymerisation durch die Chivosazole unterbindet somit also auch die Cytokinese, was die erhöhte Anzahl doppelkerniger Zellen erklärt.

Auch die antimykotische Wirkung der Chivosazole A und F kann mit dem Effekt auf das Actin-Cytoskelett erklärt werden. Actin ist in der Natur ein ubiquitäres Protein. Es kommt in allen eukaryotischen Zellen vor, also auch in Pilzen [Walker & Garrill, 2006]. In Bakterien ist es jedoch nicht vorhanden. Die actininhibierende Wirkung, die in den Säugerzellen und an isoliertem Säugeractin festgestellt wurde, kann also auch für die Wachstumshemmung der Hefen und Hyphenpilze verantwortlich gemacht werden.

In den zellbasierten Tests zeigte Chivosazol A deutlich niedrigere  $IC_{50}$ -Werte als Chivosazol F, am deutlichsten war dies mit KB-3-1-Zellen, hier war Chivosazol A mehr als 10-fach so wirksam wie Chivosazol F. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine bessere Aufnahme und eine höhere Bioverfügbarkeit aufgrund des Zuckerrestes am Chivosazol A sein. Dieser ist bei Chivosazol F durch eine Hydroxylgruppe ersetzt. Im zellfreien Test (Actin-Polymerisation) spielt die Bioverfügbarkeit keine Rolle, hier ist der Unterschied zwischen den Chivosazolen auch nicht so deutlich und nur in den höchsten Konzentrationen erkennbar.



Die Wirkung der Chivosazole auf das Actin-Cytoskelett war vor der Durchführung der HCA bekannt und publiziert [Diestel et al., 2009], sollte aber in der HCA bestätigt werden. Chivosazol A war dabei sowohl eine Verbindung des Referenzsatzes als auch eine „blinde“ Probe. Wie erwartet, ähnelten sich beide Profile mit einem ES von 0,92 und bildeten zusammen ein Cluster aus. Chivosazol F war zwar nicht im selben Cluster, zeigte jedoch eine hohe Ähnlichkeit. Der nächste Nachbar zu Chivosazol A und F war Amanitin, ein Inhibitor der mRNA-Synthese. Diese Verbindung war zwar in anderen Analysen (ohne die Chivosazole) in der Nähe der DMSO-Kontrolle zu finden, dies war in diesem Cluster allerdings nicht der Fall. Worin die Ähnlichkeiten der Chivosazole zu Amanitin begründet sind, müsste weiter untersucht werden. Anders als zu erwarten, gruppierte sich keine andere actinwirksame Verbindung des Referenzsatzes in der Nähe der Chivosazole. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die anderen Verbindungen dieser Wirkungsgruppe entweder zu hoch konzentriert waren (Rhizopodien, Cytochalasin) oder eine entgegengesetzte Wirkung auf die Actinfilamente zeigten (Chondramid). Letzteres wirkt fördernd auf die Polymerisation der Actinfilamente [Sasse et al., 1998] und nicht hemmend wie die Chivosazole.

Die Affinität von Chivosazol F zum P-Glycoprotein lag bei 6,7. Dieser Wert ist zwar im Vergleich zu Chivosazol A oder Epothilon leicht erhöht, verglichen mit Vinblastin (115) aber sehr gering.

Der primäre Wirkort der Chivosazole ist Actin. Um die genaue Bindungsstelle im Actinmolekül herauszufinden, könnten z. B. Kristallstrukturanalysen durchgeführt werden. Solche Untersuchungen liegen für andere Actin-Inhibitoren vor [Diestel et al., 2009].

#### **4.2.4 S522**

Die ebenfalls aus Myxobakterien stammende Verbindung S522 zeigte ähnliche antiproliferative Aktivitäten wie die Chivosazole. In den mikrobiologischen Tests konnte allerdings keine Wirkung festgestellt werden. Die Fluoreszenzfärbungen zeigten sehr auffällige Phänotypen nach einer eintägigen Inkubation der PtK2-Zellen mit S522. Die Zellen waren ineinander verschlungen. In den Actin-, Microtubuli- und ER-Färbungen konnte aber kein spezifischer Effekt in den gefärbten Strukturen beobachtet werden. Lediglich der auffällige morphologische Phänotyp war überall festzustellen.

Die HCA sollte Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus von S522 geben. S522 führte zu einem Profil, das nur geringe Ähnlichkeiten zu anderen Profilen zeigte.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass im Satz der Referenzverbindungen keine Probe vorhanden ist, die den gleichen Wirkmechanismus aufweist wie S522. Eine andere Erklärung könnte das Fehlen passender Antikörper in dieser HCA sein. Die S522 ähnlichsten Profile waren die einer mikrotubuliwirksamen Verbindung (Taxol) und zweier CDK-Inhibitoren (Indirubin-3'-monoxim und Purvalanol A). Aufgrund der Gruppierung mit den CDK-Inhibitoren wurde ein Effekt von S522 auf den Zellzyklus eukaryotischer Zellen postuliert. Dieser konnte bestätigt werden. In der Gegenwart von S522 kam es zu einer deutlichen Anreicherung der Zellen in der G0/G1-Phase. Es hat hier also eine Verzögerung des Übergangs in die S-Phase stattgefunden. Die Hypothese, dass S522 möglicherweise ein Inhibitor einer Kinase ist, die für den Zellzyklus wichtig ist, sollte weiter verfolgt werden.

#### 4.2.5 Prismatomerin, Plumericin, Isoplumericin

Die drei Verbindungen Prismatomerin, Plumericin und Isoplumericin ähneln sich strukturell sehr stark, dennoch gab es Unterschiede in ihrer Effektivität gegenüber Säugerzellen, Mikroorganismen und auch in zellfreien Tests. Prismatomerin zeigte z. B. bei den Versuchen mit den Standardsätzen der Säugerzelllinien und der Mikroorganismen die höchste Aktivität, gefolgt von Isoplumericin und Plumericin.

Bei allen drei Verbindungen waren auffällig große Hemmhöfe in den Agardiffusionstests zu beobachten, vor allem bei den Pilzen. Mit  $IC_{50}$ -Werten im zweistelligen nanomolaren bis einstelligen mikromolaren Bereich lagen die Iridoide, bezogen auf die biologische Wirksamkeit, zwischen den Tetramsäuren und den Myxobakterien-Substanzen Chivosazol und S522.

Vor der Durchführung der High-Content Analyse war bekannt, dass Prismatomerin, Plumericin und Isoplumericin einen Effekt auf die Mikrotubuli haben, dies konnte auch *in vitro* gezeigt werden [Krohn et al., 2007 und persönliche Mitteilungen Dr. F. Sasse]. In der HCA konnte diese Beobachtung bestätigt werden, da Prismatomerin und Plumericin in einem Cluster mit mikrotubuliwirksamen Verbindungen zu finden waren. Isoplumericin hingegen gruppierte sich mit Chivosazol A und drei Topoisomerase-Inhibitoren. Beiden Hinweisen wurde in Folgeversuchen z. T. nachgegangen. So konnte zunächst auch in zellfreien Actin-Polymerisationstests gezeigt werden, dass Prismatomerin, Plumericin und Isoplumericin einen Effekt auf die Actinfilamente haben. Basierend auf großen Ähnlichkeiten des Profils von Isoplumericin zu denen dreier Topoisomerase-Inhibitoren wurden Caspase-Tests durchgeführt. Topoisomerase-Inhibitoren induzieren häufig Apoptose in Zellen, diese geht mit einer erhöhten Caspase-Aktivität einher. Auch durch die Behandlung der Zellen mit

Prismatomerin, Plumericin und Isoplumericin wurde die Caspase-Aktivität erhöht. Versuche, ob die Verbindungen auch tatsächlich einen Effekt auf eine Topoisomerase haben, stehen noch aus. Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass diese drei Verbindungen mehrere Wirkmechanismen aufweisen, wie viele andere Naturstoffe auch.

### **4.3 Substanzsammlung aus Myxobakterien**

Mit der Substanzsammlung aus Myxobakterien konnte erneut an mehreren Beispielen die Funktionalität der High-Content Analyse belegt werden. In einigen Fällen war nur der Wirkmechanismus der Hauptverbindung eines Satzes an strukturell verwandten Verbindungen bekannt, der gleiche Wirkmechanismus für die noch nicht weiter untersuchten verwandten Verbindungen konnte in der HCA an einigen Beispielen gezeigt werden.

Die Wirkgruppe der Elektronentransport-Inhibitoren ergab besonders gute Ergebnisse. Hier waren sehr viele Verbindungen in einer Gruppe der SOM zu finden. Bei der Betrachtung der Färbung (Heat Map) fällt auf, dass in der in Abbildung 3-29 dargestellten Gruppe eher grüne Bereiche zu finden waren, also vergleichsweise niedrige Werte für die jeweiligen Deskriptoren vorlagen. Dies könnte damit erklärt werden, dass der Stoffwechsel der Zellen aufgrund der Inhibierung der Atmungskette deutlich verlangsamt wurde. Für die übrigen dort gruppierten Substanzen, z. B. Maltepolid und Tartolon, könnte ein ähnlicher Wirkmechanismus postuliert werden.

Um mehr Informationen aus diesem Ansatz zu gewinnen, könnte das Cluster-Verhalten einzelner, interessanter Verbindungen untersucht und in den Datensatz der Referenzverbindungen aufgenommen werden.

### **4.4 Zusammenfassender Ausblick für die HCA**

Das Ziel, die High-Content Analyse zu etablieren und ihre Funktionalität zu zeigen, wurde erreicht. Es konnte an zahlreichen Beispielen der Referenzsubstanzen und der Naturstoffsammlung aus Myxobakterien klar gezeigt werden, dass Substanzen mit ähnlichem Wirkmechanismus zusammen gruppiert werden. Für einige Verbindungen mit unbekanntem Wirkmechanismus konnten so schon Hinweise erhalten werden, die zur Aufklärung dieses Mechanismus führen könnten. Soweit den Hinweisen nachgegangen werden konnte, wurden sie bestätigt. Die HCA stellt also eine geeignete Methode dar, Wirkmechanismen verschiedener Moleküle genauer zu evaluieren.

Dennoch gibt es zahlreiche Möglichkeiten, um diese Methode zu variieren oder noch weiter zu optimieren. In den vorherigen Abschnitten wurden einige Variationen bereits genannt. Dazu gehört unter anderem der Vergleich weiterer Zelllinien. Dabei könnten auch verschiedene Zelllinien in *einem* Ansatz verwendet werden, um zellart-spezifische Effekte der Proben zu evaluieren, wie bei Tanaka et al. [2005]. Die Verwendung ergänzender/alternativer Antikörper und Farbstoffe wäre eine zusätzliche Variationsmöglichkeit. Eine weitere bereits angesprochene Veränderung stellen konzentrationsabhängige Untersuchungen dar. Vor allem bei Verbindungen wie den in dieser Arbeit getesteten Tetransäuren wäre der Einsatz verschiedener Konzentrationen jeder Verbindung sinnvoll. Von vielen kleinen Molekülen wird aber vermutet, dass sie mit steigender Konzentration an mehr Targets binden. Selbst für jedes einzelne Target kann die ausgelöste Antwort in der Zelle vom Sättigungsgrad der Bindung abhängen [Mitchison, 2005].

Weitere mögliche Variationen böten verschiedene Inkubationszeiten [Abassi et al., 2009]. In der hier durchgeführten High-Content Analyse wurden die Zellen über Nacht mit den Proben inkubiert, um sowohl spezifische als auch sekundäre Effekte zuzulassen. Es wäre daher möglich, dass sich bei veränderten Inkubationszeiten andere Cluster ergäben.

Einen sehr großen Spielraum bietet die HCA vor allem bei der Analyse der automatisch erstellten Bilder. Zum einen kann noch viel detaillierter in die Analyse der Ergebnisse einzelner Verbindungen eingestiegen werden, indem die für das Clusterverhalten wichtigsten Deskriptoren bestimmt werden. Des Weiteren können auch mit der zum Gerät gehörigen Software MetaXpress und der „Integrierten Morphometrie-Analyse“ noch weitere morphologische Parameter bestimmt werden, wie in 4.1.4 erwähnt. Zusätzlich gibt es inzwischen andere Programme, die eine Auswertung von Bildern ermöglichen, wie z. B. der von Jones et al. [2008] entwickelte „CellProfiler Analyst“.

Für einen noch größeren Erfolg der HCA wäre eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Biologen, Statistikern und Bioinformatikern sinnvoll.

#### Ist die HCA hochdurchsatzfähig?

Der Drang nach hochdurchsatzfähigen Tests wird immer größer. Bei der hier etablierten HCA ging es nicht um hohen Durchsatz (High-Throughput), sondern um hohen Informationsgehalt (High-Content). Es sollten lediglich kleinere Substanzgruppen mit dem Referenzsatz verglichen werden. In der Arbeitsgruppe sind

allerdings auch verschiedene Substanzsammlungen vorhanden, daher wäre eine Hochdurchsatzanwendung der automatischen Mikroskopie wünschenswert. Ob das praktisch durchführbar ist, soll im Folgenden diskutiert werden.

Die automatische Aussaat der Zellen stellt kein Problem dar, vorausgesetzt ein passender Pipettierroboter ist vorhanden. Lediglich das Vorbereiten der Zellsuspension müsste weiterhin manuell erfolgen. Für die Fixierung und Färbung könnte ein Washer zusammen mit einem Pipettierroboter verwendet werden. Diese Geräte werden von mehreren Firmen angeboten. Hier müsste nur überprüft werden, ob die Zellen die Prozedur überstehen, so dass genug Zellen für die Analyse vorhanden sind.

Für die Akquise der Bilder müssen die Einstellungen nicht verändert werden. Die Belichtungszeiten für die einzelnen Antikörper sind zwar unterschiedlich, von Ansatz zu Ansatz aber sehr ähnlich. Daher können sie, einmal optimiert, für die weiteren Ansätze übernommen werden. Ein limitierender Faktor ist hierbei die Dauer der Messungen. Für die Erstellung der Bilder einer MTP-384 (mit vier Bildern pro Well) werden, je nach Intensitäten der Färbungen und darauf basierenden Belichtungszeiten, zwischen 1-3 h benötigt, für einen Ansatz mit sechs Platten also ca. 12 h. Bei der Auswertung der Bilder hat die Zeit ebenfalls einen einschränkenden Einfluss. Die Auswertung einer Platte dauert ca. 3 h. Es können allerdings mehrere Auswertungen (an mehreren Computern) parallel durchgeführt werden. Hinzu kommt hier, dass die Einstellungen nicht für alle Ansätze gleich sind. Die Schwankungen, die bei den Färbungen auftreten, müssen hier manuell durch die optimale Wahl der Intensitäten der Objekte eliminiert werden, um eine gute und genaue Erkennung zu gewährleisten. Dies ist zeitaufwändig und verringert den Durchsatz. Die Analyse der Daten mit AcuityXpress ist dann nur manuell durchführbar. Hier müssen die Daten mit verschiedenen Methoden ausgewertet und miteinander verglichen werden. Ist der Anwender einmal mit der Software vertraut, so stellt auch die Auswertung keinen großen zeitlichen Aufwand mehr dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die HCA theoretisch hochdurchsatzfähig ist. Die meisten limitierenden Schritte könnten automatisiert werden. Praktisch jedoch würde die Etablierung einen hohen finanziellen und zeitlichen Aufwand bedeuten. Es sollten aber zumindest einzelne Schritte automatisiert werden, um die in dieser Arbeit etablierte HCA zu erleichtern, indem z. B. vorhandene Pipettierroboter noch mehr in den Arbeitsprozess eingebaut werden. Zur Charakterisierung kleinerer Substanzbanken ist die HCA aber in der vorliegenden Form durchaus schon geeignet. So sollte es

auch möglich sein, in diversifizierten Bibliotheken nach Verbindungen zu suchen, die in einen gewünschten Stoffwechsel- oder Signalweg eingreifen oder in chemischen Substanzbibliotheken von verwandten Strukturen „Ausreißer“ zu finden, die ein von der Hauptgruppe abweichendes Profil zeigen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abassi,Y.A., Xi,B., Zhang,W., Ye,P., Kirstein,S.L., Gaylord,M.R., Feinstein,S.C., Wang,X. & Xu,X. (2009). Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects. *Chem. Biol.*, 16, 712-723
- Abdel-Kader,M.S., Wisse,J., Evans,R., van der Werff,H. & Kingston,D. (1997). Bioactive Iridoids and a New Lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname Rainforest. *J. Nat. Prod.*, 60, 1294-1297
- Ahram,M. & Petricoin,E.F. (2008). Proteomics Discovery of Disease Biomarkers. *Biomark. Insights*, 3, 325-333
- Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K. & Walter,P. (1994). Molecular biology of the cell. *Garland Publishing, Inc.*, 3. Auflage
- Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K. & Walter,P. (2004). Molekularbiologie der Zelle. *Wiley-VCH Verlag*, 4. Auflage
- Altman,K.-H., Höfle,G., Müller,R., Mulzer,J. & Prantz,K. (2009). *The Epothilons: An Outstanding Family of Anti-Tumor Agents*. In: Kinghorn,A.D., Falk,H. & Kobayashi,J. (Editors): Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 90, *Springer-Verlag/Wien*
- Ang,W.H. & Dyson,P.J. (2006). Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 4003-4018
- Aoki,S., Higuchi,K., Ye,Y., Satari,R. & Kobayashi,M. (2000). Melophlins A and B, Novel Tetramic Acids Reversing the Phenotype of *ras*-Transformed Cells, from the Marine Sponge *Melophlus sarassinorum*. *Tetrahedron*, 56, 1833-1836
- Bae,M.A., Kang,H.S., Rue,S.W., Seu,J.H. & Kim,Y.H. (1998). Enhanced Expression of Fas Ligand is Associated with Aburatubolactam C-Induced Apoptosis in Human Jurkat T Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246, 276-281
- Bae,M.A., Yamada,K., Ijuin,Y., Tsuji,T., Yazawea,K., Tomono,Y. & Uemura,D. (1996). Aburatubolactam A, a Novel Inhibitor of Superoxide Anion Generation from a Marine Microorganism. *Heterocycl. Commun.*, 2, 315-318
- Baschong,W. & Landmann,L. (2006). Fluorescence Microscopy. In: Celis,J.E. (Editor): Cell Biology, a Laboratory Handbook. *Elsevier Academic Press*, 3. Auflage
- Blake,R.A. (2001). Cellular screening assays using fluorescence microscopy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 1, 533-539
- Bode,H.B. & Müller,R. (2005). The Impact of Bacterial Genomics on Natural Product Research. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 6828-6846
- Boulamwini,J.K. (2000). Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. *Curr. Pharm. Des.*, 6, 379-392
- Brahmachari,G. (2009). Mother Nature – An Inexhaustible Source of Drugs and Lead Molecules. In: Brahmachari,G. (Editor): Natural Products - Chemistry, Biochemistry and Pharmacology, *Alpha Science International LTD.*

- Briujnincx, P.C.A. & Sadler, P.J. (2007). New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 197-206
- Butcher, R.A. & Schreiber, S.L. (2005). Using genome-wide transcriptional profiling to elucidate small-molecule mechanism. *Curr. Opin. Chem Biol.*, 9, 25-30
- Butler, M.S. & Newman, D.J. (2008). Mother nature's gifts to diseases of man: The impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. *Prog. Drug Res.*, 65, 1-44
- Butler, M.S. (2004). The role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J. Nat. Prod.*, 67, 2141-2153
- Butte, A. (2002). The use and analysis of microarray data. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1, 951-960
- Chuakul, W., Soonthornchareonnon, N. & Ruangsomboon, O. (2003). *Prismatomeris tetrandra* (Roxb.) K. Schumann. In: Lemmens, R.H.M.J. & Bunyapraphatsara, N. (Editors): Plant Resources of South-East Asia No 12(3). Medicinal and poisonous plants 3. *Backhuys Publishers, Leiden*, 336-337
- Clardy, J. & Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, 829-837
- Connally, R.E., Vesey, G. & Morgan, C. (2009). Flow Cytometry. In: Goldys, E.M. (Editor): Fluorescence Applications in Biotechnology and the Life Sciences, *Wiley-Blackwell*, 245-267
- Diestel, R., Irschik, H., Jansen, R., Khalil, M., Reichenbach, H. & Sasse, F. (2009). Chivosazoles A and F, Cytostatic Macrolides from Myxobacteria, Interfere with Actin. *ChemBioChem*, 10, 2900-2903
- Elsässer, B., Krohm, K., Akhtar, M.N., Flörke, U., Kouam, S.F., Kuigoua, M.G., Ngadjui, B.T., Abegaz, B.M., Antus, S. & Kurtan, T. (2005). Revision of the Absolute Configuration of Plumericin and Isoplumericin from *Plumeria rubra*. *Chem. Biodivers.*, 2, 799-808
- Feng, Y., Mitchison, T.J., Bender, A., Young, D.W. & Tallarico, J.A. (2009). Multi-parameter phenotypic profiling: using cellular effects to characterize small-molecule compounds. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8, 567-578
- Firn, R. (2010). Nature's Chemicals. *Oxford University Press*
- Firn, R.D. & Jones, C.G. (2003). Natural products - a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.*, 20, 382-391
- Gallagher, T.F., Seibel, G.L., Kassis, S., Laydon, J.T., Blumenthal, M.J., Lee, J.C., Lee, D., Boehm, J., Fier-Thompson, S.M., Abt, J.W., Soreson, M.E., Smietana, J.M., Hall, R.F., Garigipati, R.S., Bender, P.E., Erhard, K.F., Krog, A.J., Hofmann, G.A., Sheldrake, P.L., McDonnell, P.C., Kumar, S., Young, P.R. & Adams, J.L. (1997). Regulation of Stress-Induced Cytokine Production by Pyridinylimidazoles; Inhibition of CSBP Kinase. *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 49-64
- Ghisalberti, E.L. (2003). Bioactive Tetramic Acid Metabolites. In: Atta-ur-Rahman (Editor): Studies in Natural Products Chemistry, Volume 28, *Elsevier*, 109-163



- Giuliano, K.A. (2007). Optimizing the Integration of Immunoreagents and Fluorescent Probes for Multiplexed High Content Screening Assays. In: Taylor, D.L., Haskins, J.R. & Giuliano, K.A. (Editors): High Content Screening, *Methods in Molecular Biology*, Volume 356, Humana Press, 189-193
- Giuliano, K.A., DeBiasio, R.L., Dunlay, R.T., Gough, A., Volosky, J.M., Zock, J., Pavlakakis, G.N. & Taylor, D.L. (1997). High-Content Screening: A New Approach to Easing Key Bottlenecks in the Drug Discovery Process. *J. Biomol. Screen.*, 2, 249-259
- Giuliano, K.A., Haskins, J.R. & Taylor, D.L. (2003). Advances in High Content Screening for Drug Discovery. *Assay. Drug Dev. Technol.*, 4, 565-577
- Graupner, P.R., Carr, A., Clancy, E., Gilbert, J., Bailey, K.L., Derby, J.-A. & Gerwick, B.C. (2003). The Macrocyclins: Novel Cyclic Tetramic Acids with Herbicidal Activity Produced by *Phoma macrostoma*. *J. Nat. Prod.*, 66, 1558-1561
- Gray, N.S., Wodika, L., Thunnissen, A.-M.W.H., Norman, T.C., Kwon, S., Espinoza, H., Morgan, D.O., Barnes, G., LeClerc, S., Meijer, L., Kim, S.-H., Lockhart, D.J. & Schultz, P.G. (1998). Exploiting Chemical Libraries, Structure, and Genomics in the Search for Kinase Inhibitors. *Science*, 281, 533-538
- Gronewold, T.M.A., Sasse, F., Lünsdorf, H. & Reichenbach, H. (1999). Effects of rhizopodin and latrunculin B on the morphology and on the actin cytoskeleton of mammalian cells. *Cell Tissue Res.*, 295, 121-129
- Habermehl, G., Hammann, P.E. & Krebs, H.C. (2002). *Naturstoffchemie. Springer-Verlag*, 2. Auflage
- Hambley, T.W. (2007). Metal-Based Therapeutics. *Science*, 318, 1392-1393
- Hamburger, M.O., Cordell, G.A. & Ruangrungsi, N. (1991). Traditional medicinal plants of Thailand XVII. Biologically active constituents of *Plumeria rubra*. *J. Ethnopharmacol.*, 33, 289-292
- Han, J.-W., Ahn, S.H., Park, S.H., Wang, S.Y., Bae, G.-U., Seo, D.-W., Kwon, H.-K., Hong, S., Lee, H.Y., Lee, Y.-W. & Lee, H.-W. (2000). Apicidin, a Histone Deacetylase Inhibitor, Inhibits Proliferation of Tumor Cells via Induction of p21<sup>WAF1/Cip1</sup> and Gelsolin. *Cancer Res.*, 60, 6068-6074
- Henderson, J.A. & Phillips, A.J. (2008). Total Synthesis of Aburatubolactam A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47, 8499-8501
- Herbert, J.M., Augereau, J.M., Gleye, J. & Maffrand, J.P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 993-999
- Hines, J., Roy, M., Cheng, H., Agapakis, C.M., Taylor, R. & Crews, C.M. (2006). Myriaporone 3/4 structure-activity relationship studies define a pharmacophore targeting eukaryotic protein synthesis. *Mol. Biosyst.*, 2, 371-379
- Huet, G., Gouyer, V., Delacour, D., Richet, C., Zanetta, J.P., Delannoy, P., Degand, P. (2003). Involvement of glycosylation in the intracellular trafficking of glycoproteins in polarized epithelial cells. *Biochimie*, 85, 323-330

- Huss,M., Sasse,F., Kunze,B., Jansen,R., Steinmetz,H., Ingenhorst,G., Zeeck,A. & Wieczorek,H. (2005). Archazolid and apicularen: Novel specific V-ATPase inhibitors. *BMC Biochem.*, 6, 13
- Inglese,J., Johnson,R.L., Simeonov,A., Xia,M., Zheng,W., Austin,C.P. & Auld,D.S. (2007). High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nat. Rev. Chem. Biol.*, 8, 466-479
- Irschik,H., Jansen,R., Gerth,K., Höfle,G. & Reichenbach,H. (1995). Chivosazol A, a New Inhibitor of Eukaryotic Organisms Isolated from Myxobacteria. *J. Antibiot.*, 48, 962-966
- Jansen,R., Irschik,H., Reichenbach,H. & Höfle,G. (1997). Chivosazoles A-F: Novel Antifungal and Cytotoxic Macrolides from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). *Liebigs Ann.*, 8, 1725-1732
- Jensen,N.A., Gerth,K., Grotjohann,T., Kapp,D., Keck,M. & Niehaus,K. (2009). Establishment of a high content assay for the identification and characterisation of bioactivities in crude bacterial extracts that interfere with the eukaryotic cell cycle. *J. Biotechnol.*, 140, 124-134
- Johnston,P.A. (2008). Automated High Content Screening Microscopy. In: Haney,S.A. (Editor): High Content Screening, *Wiley*, 25-42
- Jones,T.R., Kang,I.H., Wheeler,D.B., Lindquist,R.A., Papallo,A., Sabatini,D.M., Golland,P. & Carpenter,A.E. (2008). CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens. *BMC Bioinformatics*, 9, 482
- Jordan,M.A., Thrower,D. & Wilson,L. (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J. Cell Sci.*, 102, 401-416
- Kaufmann,G.F., Sartorio,R., Lee,S.-H., Rogers,C.J., Meijler,M.M., Moss,J.A., Clapham,B., Brogan,A.P., Dickerson,T.J. & Janda,K.D. (2005). Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *PNAS*, 102, 309-314
- Keefer,S. & Zock,J. (2008). Approaching High Content Screening and Analysis: Practical Advice for Users. In: Haney,S.A. (Editor): High Content Screening, *Wiley*, 3-24
- Khalil,M.W., Sasse,F., Lünsdorf,H., Elnakady,Y.A. & Reichenbach,H. (2006). Mechanism of Action of Tubulysin, an Antimitotic Peptide from Myxobacteria. *Chembiochem*, 7, 678-683
- Kim,Y.B., Lee,K.-H., Sugita,K., Yoshida,M. & Horinouchi,S. (1999) Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase. *Oncogene*, 18, 2461-2470
- Kimball,P.M. & Sell,S. (1989). Cyclosporin Immunosuppression Mediated by Calcium/Sodium Imbalance. *Cancer Res.*, 49, 877-882
- Knoth,T., Warburg,K., Katzka,C., Rai,A., Wolf,A., Brockmeyer,A., Janning,P., Reubold,T.F., Eschenburg,S., Manstein,D.J., Hübel,K., Kasier,M. & Waldmann,H. (2009). The Ras Pathway Modulator Meloplin A Targets Dynamins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 7240-7245

- Koehn, F.E. & Carter, G.T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 4, 206-20
- König, G.M., Kehraus, S., Seibert, S.F., Abdel-Lateff, A. & Müller, D. (2006). Natural Products from Marine Organisms and Their Associated Microbes. *ChemBioChem*, 7, 229-238
- Korn, K. & Krausz, E. (2007). Cell-based high-content screening of small-molecule libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11, 503-510
- Köster, M., Lykke-Anderson, S., Elnakady, Y.A., Gerth, K., Washausen, P., Höfle, G., Sasse, F., Kjems, J. & Hauser, H. (2003). Ratjadones inhibit nuclear export by blocking CRM1/exportin 1. *Exp. Cell Res.*, 286, 321-331
- Kothari, V. (2007). Pharmacologically Active Bioproducts. *Biotech Books*
- Krohn, K., Gehle, D., Dey, S.K., Nahar, N., Mosihuzzaman, M., Sultana, N., Sohrab, M.H., Stephens, P.J., Pan, J.-J. & Sasse, F. (2007). Prismaticomerin, a New Irodoid from *Prismaticomeris tetrandra*. Structure Elucidation, Determination of Absolute Configuration, and Cytotoxicity. *J. Nat. Prod.*, 70, 1339-1343
- Krutzik, P.O., Crane, J.M., Clutter, M.R. & Nolan, G.P. (2008). High-content single-cell drug screening with phosphospecific flow cytometry. *Nat. Chem. Biol.*, 4, 132-142
- Kunze, B., Steinmetz, H., Höfle, G., Huss, M., Wieczorek, H. & Reichenbach, H. (2006). Cruentaren, a New Antifungal Salicylate-Type Macrolide from *Byssosvorax cruenta* (Myxobacteria) with Inhibitory Effect on Mitochondrial ATPase Activity. *J. Antibiot.*, 59, 664-668
- Lahusen, T., De Siervi, A., Kunick, C. & Senderowicz, A.M. (2003). Alsterpaullone, a Novel Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, Induces Apoptosis by Activation of Caspase-9 Due to Perturbation in Mitochondrial Membrane Potential. *Mol. Carcinog.*, 36, 183-194
- Lang, P., Yeow, K., Nichols, A. & Scheer, A. (2006). Cellular imaging in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, 343-356
- Lee, J.C., Laydon, J.T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Green, D., McNutty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L. & Young, P.R. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372, 739-746
- Li, J.W.-H. & Venderas, J.C. (2009). Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?. *Science*, 325, 161-165
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. & Matsudaira, P. (2008). Molecular cell biology. *W.H. Freeman and Company*, 6. Auflage
- Lochner, A. & Moolman, J.A. (2006). The Many Faces of H89: A Review. *Cardiovasc. Drug Rev.*, 24, 261-274
- MacBeath, G. & Schreiber, S.L. (2000). Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science*, 289, 1760-1763

- Michael, A.P., Grace, E.J., Kotiw, M. & Barrow, R.A. (2002). Ravenic Acid, a New Tetramic Acid Isolated from a Cultured Microfungus, *Penicillium* sp.. *J. Nat. Prod.*, 65, 1360-1362
- Mitchison, T.J. (2005). Small-Molecule Screening and Profiling by Using Automated Microscopy. *ChemBioChem*, 6, 33-39
- Molecular Devices (2006). MetaXpress Image Acquisition and Analysis Software. Acquisition Guide
- Molecular Devices (2006). MetaXpress Image Acquisition and Analysis Software. Analysis Guide
- Molecular Devices (2007). AcuityXpress 2.0 software user guide
- Monneret, C. (2005). Histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 40, 1-13
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63
- Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, 66, 1022-1037
- Nickeleit, I., Zender, S., Sasse, F., Geffers, R., Brandes, G., Sörensen, I., Steinmetz, H., Kubicka, S., Carlomagno, T., Menche, D., Gütgemann, I., Buer, J., Gossler, A., Manns, M.P., Kalesse, M., Frank, R. & Malek, N.P. (2008). Agyrin A Reveals a Critical Role for the Tumor Suppressor Protein p27<sup>kip1</sup> in Mediating Antitumor Activities in Response to Proteasome Inhibition. *Cancer Cell*, 14, 23-35
- O'Keefe, B. (2001). Biologically Active Proteins from Natural Product Extracts. *J. Nat. Prod.*, 64, 1373-1381
- Oda, T., Fujita, A., Xu, J., Mochizuki, M., Ukai, K. & Namikoshi, M. (2007). Effects of Melophrins on Colony Formation of Chinese Hamster V79 Cells and IL-8 Production in PMA-stimulated HL-60 Cells. *Mar. Drugs*, 5, 1-5
- Pelkmans, L., Fava, E., Grabner, H., Hannus, M., Habermann, B., Krausz, E. & Zerial, M. (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*, 436, 78-86
- Perlman, Z.E., Slack, M.D., Feng, Y., Mitchison, T.J., Wu, L.F. & Altschuler, S.J. (2004). Multidimensional Drug Profiling By Automated Microscopy. *Science*, 306, 1194-1198
- Plattner, H. & Hentschel, J. (2006). Zellbiologie. *Thieme Verlag*, 3. Auflage
- Pospiech, A., Bietenhader, J. & Schupp, T. (1996). Two multifunctional peptide synthetases and an O-methyltransferase are involved in the biosynthesis of the DNA-binding antibiotic and antitumour agent saframycin Mx1 from *Myxococcus xanthus*. *Microbiology*, 142, 741-746
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2002). Microbiology. *McGraw-Hill*, 5. Auflage
- Rachid, S., Gerth, K. & Müller, R. (2009). NtcA – A negative regulator of secondary metabolite biosynthesis in *Sorangium cellulosum*. *J. Biotechnol.*, 140, 135-142

- Ramanathan,D.M. & LeLacheur,R.M. (2009). Evolving Role of Mass Spectrometry in Drug Discovery and Development. In: Ramanathan,R. (Editor): Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Wiley, 1-85
- Rausch,O. (2006). High content cellular screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 316-320
- Reichenbach,H. & Höfle,K. (1999). Myxobacteria as Producers of Secondary Metabolites. In: Grabley,S. & Thiericke,R. (Editors): Drug Discovery from Nature. Springer-Verlag
- Rock,K.L., Gramm,C., Rothstein,L., Clark,K., Stein,R., Dick,L., Hwang,D., Goldberg,A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, 78, 761–775
- Röder,T., Müller,H.-J. (2004). Der Experimentator: Microarrays. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage
- Römpf Online (2009). Georg Thieme Verlag, Stuttgart. URL: <http://www.roempf.com/de>, Version 3.6
- Royles,B.J.L. (1995). Naturally Occuring Tetramic Acids: Structure, Isolation, and Synthesis. *Chem. Rev.*, 95, 1981-2001
- Sasse,F., Kunze,B., Gronewold,T.M.A. & Reichenbach,H. (1998). The Chondramides: Cytostatic Agents From Myxobacteria Acting on the Actin Cytoskeleton. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90, 1559-1568
- Sasse,F., Steinmetz,H., Höfle,G. & Reichenbach,H. (1995). Gephyronic acid, a novel inhibitor of eukaryotic protein synthesis from *Archangium gephyra* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *J. Antibiot.*, 48, 21-25
- Schilstra,M.J., Martin,S. & Bayley,P.M. (1988). The Effect of Podophyllotoxin on Microtubule Dynamics. *J. Biol. Chem.*, 264, 8827-8834
- Schlenk,A., Diestel,R., Sasse,F. & Schobert,R. (2010). A Selective 3-Acylation of Tetramic Acids and the First Synthesis of Ravenic Acid. *Chem. Eur. J.*, im Druck
- Schobert,R. & Schlenk,A. (2008). Tetramic and tetronic acids: An update on new derivatives and biological aspects. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 4203-4221
- Schobert,R. (2007). Domino syntheses of bioactive tetronic and tetramic acids. *Naturwissenschaften*, 94, 1-11
- Starkuviene,V. & Pepperkok,R. (2007). The potential of high-content high-throughput microscopy in drug discovery. *Br. J. Pharmacol.*, 152, 62-71
- Su,G.H., Sohn,T.A., Ryu,B. & Kern,S.E. (2000). A Novel Histone Deacetylase Inhibitor Identified by High-Throughput Transcriptional Screening of a Compound Library. *Cancer Res.*, 60, 3137-3142
- Tanaka,M., Bateman,R., Rauh,D., Vaisberg,E., Ramachandani,S., Zhang,C., Hansen,K.C., Burlingame,A.L., Trautman,J.K., Shokat,K.M. & Adams,C.L. (2005) An

Unbiased Cell Morphology-Based Screen for New, Biologically Active Small Molecules. *PLoS Biol.*, 3, 764-776

Taylor,D.L. (2007). Past, Present, and Future of High Content Screening and the Field of Cellomics. In: Taylor,D.L., Haskins,J.R. & Giuliano,K.A. (Editors): High Content Screening, *Methods in Molecular Biology, Volume 356, Humana Press*, 3-18

Takeuchi,O., Akira,S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.*, 1, 625-635

Ulanovskaya,O.A., Janjic,J., Suzuki,M., Sabharwal,S.S., Schumcker,P.T., Kron,S.J. & Kozmin,S.A. (2008). Synthesis Enables Identification of the Cellular Target of Leucascandrolide A and Neopeltolide. *Nat. Chem. Biol.*, 4, 418-424

Van Maanen,J.M.S., Ret  l,J., de Vries,J. & Pinedo,H.M. (1988). Mechanism of Action of Antitumor Drug Etoposide: A Review. *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 1526-1533

Vlahos,C.J., Matter,W.F., Hui,K.Y. & Brown,R.F. (1994). A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.*, 269, 5241-5248

Walker,S.K. & Garrill,A. (2006). Actin microfilaments in fungi. *Mycologist*, 20, 26-31

Wang,C.-Y., Wang,B.-G., Wiryowidagdo,S., Wray,V., van Soest,R., Steube,K.G., Guan,H.-S., Proksch,P. & Ebel,R. (2003). Melophlins C-O, Thirteen Novel Tetramic Acids from the Marine Sponge *Melophlus srassinorum*. *J. Nat. Prod.*, 66, 51-56

Wiert,C. (2006). Medicinal plants of the asia-pacific: Drugs for the future?. *World Scientific Publishing*, 465-467

Xu,J., Hasegawa,M., Harada,K., Kobayashi,H., Nagai,H. & Namikoshi,M. (2006). Melophlins P, Q, R, and S: Four New Tetramic Acid Derivatives, from Two Palau Marine Sponges of the Genus *Melophlus*. *Chem. Pharm. Bull.*, 54, 852-854

Yarrow,J.C., Feng,Y., Perlman,Z.E., Kirchhausen,T. & Mitchison,T.J. (2003). Phenotypic Screening of Small Molecule Libraries by High Throughput Cell Imaging. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 6, 279-286

Yoshinari,T., Ohmori,K., Schrems,M.G., Pfaltz,A. & Suzuki,K. (2010). Total Synthesis and Absolute Configuration of Macrocidin A, a Cyclophane Tetramic Acid Natural Product. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 881-885

Zhu,F., Han,B., Kumar,P., Liu,X., Ma,X., Wei,X., Huang,L., Guo,Y., Han,L., Zheng,C. & Chen,Y. (2009). Update of TTD: Therapeutic Target Database. *Nucleic Acids Res.*, 38, 787-791

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
μ	mikro
ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette-transporter</i>
Abu	Aburatubolactam
Ak	Antikörper
Asf/n, <i>A. fumigatus/niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus/niger</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	willkürliche Einheit ( <i>arbitrary unit</i> )
Boc, <i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
c	centi
Caa, <i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCD	<i>charged coupled device</i>
CDK	cyclinabhängige Kinase ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
cDNA	komplementäre oder Kopie-DNA ( <i>complementary, copy</i> )
Ciprofl.	Ciprofloxacin
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Depolym.	Depolymerisation
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EBM	<i>Endothelial Basal Medium</i>
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ES	Quadrat des Euklidischen Abstands
et al.	und andere ( <i>et alii</i> )
EtOH	Ethanol
euk.	eukaryotisch
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
F-Actin	filamentöses Actin
FBS	fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G-Actin (G-Puffer)	globuläres Actin (der dafür geeignete Puffer)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCA	High-Content Analyse
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Hna, <i>H. anomala</i>	<i>Hansenula anomala</i>
HTS	Hochdurchsatz Screening ( <i>High-Throughput Screening</i> )
HUV./HMV.	HUVEC-/HMVEC-Zellen
IC	inhibierende Konzentration ( <i>inhibitory concentration</i> )
Ink.	Inkubation
IXM	ImageXpress Micro
k. U.	kein Unterschied
Kbp, <i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Konz.	Konzentration

I	Liter
log	Logarithmus
m	Meter oder milli
M	molar
Mac	Macrocidin
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein ( <i>mitogen-activated protein</i> )
Mcl, <i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
MDR	<i>multidrug resistance</i>
Mel	Melophlin
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MeOH	Methanol
min	Minute
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MTP(-96/-384)	Mikrotiterplatte (mit 96/384 Wells)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCS	<i>Multi Wavelength Cell Scoring</i>
Myp, <i>M. phlei</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>
n	nano
n.d.	nicht bestimmt ( <i>not determined</i> )
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PC	Personal Computer
P-Glycoprotein	<i>permeability glycoprotein</i>
P-GP-Affin.	Affinität zum P-Glycoprotein
PK	Pearsons Korrelationskoeffizient
PMA	Phorbol-Myristate-Acetat
Polym.	Polymerisation
Prism.	Prismatomerin
Psa, <i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pyd, <i>P. debaryanum</i>	<i>Pythium debaryanum</i>
Rav	Raveninsäure
RGA	Reporter-Gen-Assay
RLU	Relative Lumineszenz Einheiten ( <i>relative luminescence units</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	RNA-Interferenz ( <i>RNA interference</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
Scc, <i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sec	Sekunde
SOM	<i>Self-organizing maps</i>
sp.	Spezies
S-Phase	Synthese-Phase
Sta, <i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TB	Terabyte
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TolC, <i>E. coli TolC</i>	<i>Escherichia coli tolC</i>
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
ü. N.	über Nacht
Verd.	Verdünnung
Vp.	Verapamil
W	Well
W1/W2/W3	Wellenlänge 1/2/3
WST	<i>Water soluble tetrazolium</i>
Z	Zelle



## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Überblick über eine tierische Zelle [nach Campbell & Reece, 2006]....	3
Abbildung 1-2: Die drei Komponenten des Cytoskeletts.....	4
Abbildung 1-3: Der Zellzyklus [Alberts et al., 2004] .....	5
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung.....	6
Abbildung 1-5: Chemische Strukturen der Tetramsäure (2,4-Pyrrolidindion) und der 3-Acyltetramsäure.....	9
Abbildung 1-6: Strukturen der natürlichen Melophline A, B, C, G, M, P, Q und R.....	11
Abbildung 1-7: Strukturen der „neuen“ Melophline „A/B“ und „A/C“ .....	12
Abbildung 1-8: Struktur des Calcium-Komplexes von Melophlin A .....	12
Abbildung 1-9: Strukturen der Raveninsäure Rav402 und des Raveninsäure-Derivats Rav369 .....	14
Abbildung 1-10: Chemische Strukturen von Aburatubolactam A und dem Fragment Abu527 .....	15
Abbildung 1-11: Chemische Strukturen von Macrocidin A und den Fragmenten Mac600-15, -17 und -22.....	15
Abbildung 1-12: Chemische Strukturen von Chivosazol A und Chivosazol F .....	16
Abbildung 1-13: Chemische Strukturen von Prismatomerin, Plumericin und Isoplumericin.....	17
Abbildung 1-14: Verhältnis messbarer Parameter zum Durchsatz verschiedener phänotypischer Untersuchungsmethoden .....	20
Abbildung 1-15: Das automatische Mikroskop ImageXpress Micro von Molecular Devices.....	22
Abbildung 1-16: Ablauf eines typischen HCA-Experiments [Mitchison, 2005].....	24
Abbildung 3-1: Fluoreszenzfärbung nach Melophlin-Behandlung.....	51
Abbildung 3-2: Einfluss der Melophline auf die Actin-Polymerisation.....	52
Abbildung 3-3: Zellzyklusuntersuchungen einiger Melophline und Melophlin-Komplexe .....	53
Abbildung 3-4: Fluoreszenzfärbung nach Chivosazol-Behandlung.....	57
Abbildung 3-5: Einfluss der Chivosazole auf die Actin-Polymerisation .....	58
Abbildung 3-6: Einfluss der Chivosazole auf die Actin-Depolymerisation .....	58
Abbildung 3-7: Einfluss von Chivosazol F auf den Zellzyklus .....	59

Abbildung 3-8: Fluoreszenzfärbung nach S522-Behandlung.....	60
Abbildung 3-9: Hemmung des Wachstums von <i>Pythium debaryanum</i> .....	61
Abbildung 3-10: Vergleich von Methoden zum Entfernen der Flüssigkeiten .....	62
Abbildung 3-11: Vergleich verschiedener Zelllinien .....	64
Abbildung 3-12: Segmentierung der Bilder verschiedener Zelllinien.....	65
Abbildung 3-13: Anteil von detektierbarem phosphoryliertem p38 in verschiedenen Zelllinien .....	66
Abbildung 3-14: A-498-Zellen mit 2000 Z/W und 3000 Z/W .....	68
Abbildung 3-15: Verteilung von KB-3-1-Zellen nach verschiedenen Inkubationen.....	69
Abbildung 3-16: Optimierte Protokoll der HCA .....	73
Abbildung 3-17: Erläuterung der hierarchischen Clusteranalyse .....	74
Abbildung 3-18: Hierarchische Clusteranalyse der Referenzsubstanzen .....	76
Abbildung 3-19: Hierarchische Clusteranalyse mit den Melophlinen .....	80
Abbildung 3-20: Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse mit dem Aburatubolactam-Fragment .....	81
Abbildung 3-21: Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse mit den Macrocidin-Fragmenten .....	82
Abbildung 3-22: Ausschnitt der zellbasierten hierarchischen Clusteranalyse mit den Chivosazolen A und F.....	82
Abbildung 3-23: Ausschnitt der zellbasierten hierarchischen Clusteranalyse mit S522 .....	83
Abbildung 3-24: Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse mit Prismaomerin und Plumericin .....	84
Abbildung 3-25: Ausschnitt der hierarchischen Clusteranalyse mit Isoplumericin.....	84
Abbildung 3-26: Hierarchische Clusteranalyse der Naturstoffe der Myxobakterien-Substanzsammlung .....	86
Abbildung 3-27: Ausschnitte der hierarchischen Clusteranalyse in Abbildung 3-26...	87
Abbildung 3-28: SOM-Analyse der Myxobakterien-Substanzsammlung.....	88
Abbildung 3-29: Eine Gruppe der SOM-Analyse aus Abbildung 3-28.....	89
Abbildung 3-30: Einfluss von S522 auf den Zellzyklus .....	90
Abbildung 3-31: Einfluss von Prismaomerin, Isoplumericin und Plumericin auf die Actin-Polymerisation .....	92

Abbildung 3-32: Induktion der Caspase-Aktivität .....	93
-------------------------------------------------------	----

## 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Medien für die verschiedenen Zelllinien .....	28
Tabelle 2-2: Verwendete Mikroorganismen .....	29
Tabelle 2-3: Verwendete Zelllinien .....	29
Tabelle 2-4: Deskriptoren des MWCS-Moduls .....	39
Tabelle 2-5: Deskriptoren des Transfluor-Moduls .....	39
Tabelle 2-6: Referenzverbindungen der HCA .....	44
Tabelle 3-1: Agardiffusionstests von Vergleichssubstanzen .....	47
Tabelle 3-2: Proliferationstests von Vergleichssubstanzen .....	47
Tabelle 3-3: Agardiffusionstests der Melophline .....	49
Tabelle 3-4: Proliferationstests der Melophline .....	50
Tabelle 3-5: Agardiffusionstests einiger Tetransäuren .....	54
Tabelle 3-6: Proliferationstests einiger Tetransäuren .....	55
Tabelle 3-7: Agardiffusionstests der Chivosazole A und F sowie von S522 .....	55
Tabelle 3-8: Proliferationstests der Chivosazole A und F sowie von S522 .....	56
Tabelle 3-9: Agardiffusionstests mit Prismaticerin und (Iso)Plumericin .....	61
Tabelle 3-10: Proliferationstests mit Prismaticerin und (Iso)Plumericin .....	61
Tabelle 3-11: Sets der primären Antikörper/Farbstoffe .....	71
Tabelle 3-12: Verbindungen aus der HCA-Substanzbank .....	72
Tabelle 3-13: Tetransäuren für die HCA .....	78
Tabelle 3-14: Naturstoffe für die HCA .....	78

## Danksagung

Mein größtes Dankeschön gebührt meinem Betreuer Dr. Florenz Sasse. Ich danke dir für die Supervision des „Underdocs“, die guten Diskussionen und die großartige Unterstützung. Ich habe viel von dir gelernt.

Prof. Dr. Jürgen Wehland danke ich für die Übernahme der Dissertation als Mentor und Referent. Ein großes Dankeschön an Prof. Dr. Beerhues und Prof. Dr. Schulz für die freundliche und sofortige Übernahme des Korreferats bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Danke auch an meinen Arbeitsgruppen-Chef Dr. Ronald Frank und alle anderen CBIOS für die stete Hilfsbereitschaft und das gute Klima. Dabei gilt meinen Laborkolleginnen Bettina und Wera mein besonderer Dank für die gute Arbeitsatmosphäre und die allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft. And I would like to thank Saad for being such a sunshine. An meine Ex-Kurzzeit-Kollegin Birte und die beste Praktikantin der Welt Lara: Es hat Spaß gemacht mit euch zu arbeiten.

Vielen Dank an unsere Projektpartner, die AG Laschat in Stuttgart und die AG Schobert in Bayreuth, für die Synthesen und die hilfreichen Diskussionen.

Dr. Dr. Werner Tegge und Dr. Mario Köster danke ich für die Betreuung im Thesis-Komitee und Dr. Raimo Franke für die statistische Unterstützung. Für die nette Hilfe bei den FACS-Messungen bedanke ich mich bei Maria Höxter.

Danke auch an Marina: Es ist großartig einen Menschen wie dich als Mitdotorandin zu haben. Ich danke dir und Konni für das Lösen von Computer- und anderen Problemen.

Danke an Nic und Jenny, es tut gut zu wissen, dass man nicht allein ist! Und auch an alle „Bilitewskis“, besonders Bi, Dörthe, Jeanni und Nina: Ihr wart tolle Wegbegleiter.

Natürlich gilt mein herzlicher Dank auch Anne für die fantastische Unterstützung und die hohe Akzeptanz und oft erfolgreiche Eliminierung schlechter Laune (aus einer scheinbar unerschöpflichen Gute-Laune-Quelle).

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und Indre, die mir Schritt für Schritt gezeigt haben, dass allein aneinander glauben, immer für einander da sein und ab und an ein paar nette Worte „rich“ machen können.

Danke allen, für eure kleinen und großen Beiträge, nicht nur zu dieser Arbeit!